

**VIRUS HERPES SIMPLEX: ESTUDIO DE  
SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE  
ANTIVIRALES EN UN HOSPITAL GENERAL**

**TESIS DOCTORAL**

**MANUEL COTARELO SUAREZ**


**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
MADRID 1997**

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El trabajo titulado "Virus Herpes simplx: Estudio de sensibilidad in vitro frente a antivirales en un Hospital General", realizado por Don Manuel Cotarelo Suárez, Licenciado en Farmacia, se ha llevado a cabo bajo mi dirección y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor en Farmacia.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

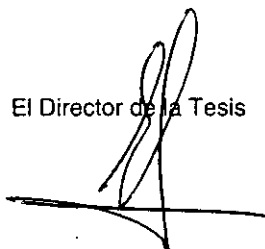
Vº Bº  
EL TUTOR (2)



Fdo.: Dr.D. Jesús Plá Alonso  
(Fecha y firma)

DNI 50.301.295

El Director de la Tesis



Dr.D. Emilio Bouza Santiago

Fdo.: Prof. Titular Microbiología-UCM  
(Fecha y firma)

DNI 2.481.833

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

El Consejo de Departamento acordó informar favorablemente sobre la solicitud de admisión a trámite de la Tesis Doctoral de D. Manuel - Cotarelo Suárez.

Fecha reunión  
Consejo Departamento  
12-12-96



Fdo.: Rafael Rotger Anglada  
(Fecha y firma)  
7-02-1997

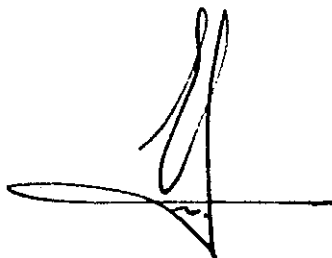
*Dr. Emilio Bouza Santiago*  
*Prof. Titular de Microbiología. U. Complutense*  
*Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y E. Infecciosas.*  
*Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"*

**El Dr. D. Emilio Bouza Santiago, Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General "Gregorio Marañón" y Profesor Titular de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.**

**CERTIFICA:**

**Que el trabajo titulado "Virus Herpes simplex: Estudio de sensibilidad in vitro frente a antivirales en un Hospital General", realizado por D. Manuel Cotarelo Suárez, Licenciado en Farmacia, se ha llevado a cabo bajo mi dirección y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor en Farmacia.**

**Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.**



**Prof. Emilio Bouza Santiago**  
**Madrid 5 de enero de 1997.**

*[...] Pero tan pronto como hube terminado el curso de los estudios, cuyo remate suele dar ingreso en el número de los hombres doctos, cambié por completo de opinión. Pues me embargaban tantas dudas y errores, que me parecía que, procurando instruirme, no había conseguido más provecho que el de descubrir cada vez más mi ignorancia. [...]*

*"Discurso del método"*  
*René Descartes*



# **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es el resultado de la colaboración de muchas personas que, de forma diversa y desinteresada, han participado en su realización. Supone un deber acordarme de ellos ahora y un orgullo haber podido trabajar a su lado.

Al Dr. D. Emilio Bouza Santiago, director de el trabajo, por el tiempo dedicado a mostrar cómo debe ser el quehacer diario. Su espíritu de trabajo y estudio, su gran experiencia clínica, unidos a una cordialidad y disponibilidad absolutas, hacen que mi experiencia junto a él haya sido sumamente positiva.

A Pilar Catalán Alonso, Piluca, Adjunta del Laboratorio de Virus del Hospital Gregorio Marañón, verdadera alma de este trabajo, por haberme enseñado todo lo que sé sobre virología, por darme ánimos en los momentos bajos y, sobre todo, por darme su amistad.

A Jesus Plá Alonso, mi tutor en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia, por la amabilidad y ayuda que ha manifestado siempre que me he dirigido a él.

A Angela Gómez Alferez, que gracias a su capacidad docente logró fomentar en mí el interés por la Microbiología Clínica. Su disponibilidad y ánimo constantes desde el comienzo son difícilmente pagables.

A Emilia Cercenado Mansilla, Carlos Sánchez Carrillo, Marisa Rivera

Franco y Ana Menasalvas Ruiz, por su inestimable ayuda, tanto en el plano científico como experimental, y por ofrecerme su amistad y cariño.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a los técnicos de laboratorio que han trabajado en el Laboratorio de Virología en el tiempo en el que estuve realizando este estudio. Muchas gracias Rosa, Concha y Choni.

En general a todas las personas integrantes del Servicio de Microiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", personal facultativo, personal técnico y secretarias, por acogerme tan bien entre ellos y por ser un equipo de profesionales tan bueno del que no sólo se puede uno enriquecer profesionalmente sino que, más importante aún, se aprenden grandes lecciones humanas.

A mi familia y amigos, por su cariño y su ánimo incondicionales.

A todos ellos, de verdad, muchas gracias.

## **ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO**

**ACV:** Aciclovir

**ADN:** Acido Desoxirribonucleico

**ADNpol:** ADN polimerasa

**ARN:** Acido Ribonucleico

**ARNm:** Acido Ribonucleico Mensajero

**ASM:** Sociedad Americana de Microbiología

**CI<sub>50</sub>:** Concentración Inhibitoria 50%

**CI<sub>90</sub>:** Concentración Inhibitoria 90%

**CI<sub>99</sub>:** Concentración Inhibitoria 99%

**ECP:** Efecto Citopático

**ERP:** Ensayo de Reducción de Placas

**EMEM:** Medio Mínimo Esencial de Earle

**CMV:** Citomegalovirus

**DU:** *Dye Uptake*. Método de absorción de colorante

**FOS:** Foscarnet

**gG:** Glicoproteína G

**HGUGM:** Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"

**HVH 6:** Herpesvirus Humano 6

**HVH 7:** Herpesvirus Humano 7

**HVH 8:** Herpesvirus Humano 8

**IgG:** Inmunoglobulina G

**LAT:** *Latency-associated Transcript*

**LCR:** Líquido Cefalorraquídeo

**MRC-5:** Línea celular de fibroblastos de pulmón de feto humano

**PBS:** Tampón Fosfato Salino

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PCV:** Penciclovir

**PVH:** Papilomavirus Humano

**R:** Resistente

**S:** Sensible

**SBF:** Suero Bovino Fetal

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**TK:** Timidín Quinasa

**UFP:** Unidades Formadoras de Placa

**VEB:** Virus de Epstein Barr

**VHS:** Virus Herpes Simplex

**VHS-1:** Virus Herpes Simplex tipo 1

**VHS-2:** Virus Herpes Simplex tipo 2

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humano

**VVZ:** Virus Varicela Zoster

## **INDICE**

	<u>Página</u>
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
1.A. Introducción a la familia <i>Herpesviridae</i>	2
1.B. Infección por Virus Herpes Simplex	13
1.B.1. Descripción del agente	13
1.B.2. Epidemiología	15
1.B.3. Patogénesis	18
1.B.4. Manifestaciones clínicas	21
1.B.4.1. Primoinfección	21
1.B.4.2. Infecciones recurrentes	24
1.B.4.3. Complicaciones de la infección por VHS	26
1.B.4.3.A. Encefalitis	26
1.B.4.3.B. Infecciones neonatales	27
1.B.4.3.C. Infección en el paciente inmunocomprometido	28
1.B.4.3.D. Posible asociación de la infección por VHS-2 con el carcinoma de cervix	29
1.C. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por Virus Herpes Simplex	31
1.C.1. Examen directo del material de las lesiones herpéticas	32
1.C.1.1. Microscopía óptica	32
1.C.1.2. Microscopía electrónica	33
1.C.1.3. Técnicas de inmunofluorescencia	33
1.C.2. Aislamiento e identificación del VHS	35
1.C.3. Pruebas serológicas	37
1.C.4. Técnicas moleculares	39

1.D. Fármacos antiherpéticos: mecanismo de acción y usos terapéuticos	41
1.D.1. Vidarabina	41
1.D.2. Aciclovir	42
1.D.3. Penciclovir/Famciclovir	45
1.D.4. Foscarnet	46
1.D.5. Otros antiherpéticos	48
1.E. Mecanismos de resistencia a antivirales en VHS	49
1.E.1. Resistencia debida a timidinquinasa alterada o deficiente	50
1.E.2. Resistencia debida a ADN polimerasa alterada	52
1.F. Métodos para la determinación <i>in vitro</i> de la sensibilidad de VHS a antivirales	55
1.F.1. Ensayo de reducción de placas	59
1.F.2. Método de absorción de colorante ( <i>dye uptake</i> -DU-)	60
1.F.3. Método de hibridación de ADN <i>Hybriwix</i> ®	61
1.G. Algunas carencias de la literatura científica sobre VHS	63
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>67</b>
3.1. Características del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"	68
3.2. Mecánica de trabajo	69
3.3. Preparación de las muestras	73



3.4. Tipado de los aislados de VHS	74
3.5. Titulación del inóculo de virus	75
3.6. Ensayo de reducción de placas	77
3.7. Método de detección rápida de resistencias a antivirales en VHS	80
3.8. Comprobación de la influencia de las células usadas para detectar la resistencia a penciclovir	82
3.9. Estudio de las historias clínicas	83
3.10. Archivo de datos	84
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>86</b>
4.1. Datos generales. Carga de trabajo	87
4.2. Datos generales: Virus Herpes Simplex	88
4.2.1. Distribución en el tiempo	92
4.3. Comparación de los métodos usados	94
4.4. Resultados del estudio de sensibilidad	97
4.4.1. Datos generales de la muestra de VHS estudiada	97
4.4.2. Resultados globales de sensibilidad	103
4.4.3. Resultados de sensibilidad según los serotipos de los aislados	106
4.4.4. Resultados de sensibilidad según los aislados de pacientes infectados o no infectados por el VIH	109
4.4.4.a. Resultados de sensibilidad en los aislados de pacientes infectados por el VIH	110
4.4.4.b. Resultados de sensibilidad en los aislados	

de pacientes no infectados por el VIH	112
4.4.5. Comprobación de las cepas resistentes	
únicamente a penciclovir	114
4.5. Resultados de la revisión de las historias clínicas	115
4.5.1. Descripción de los pacientes	115
4.5.1.a. Pacientes VIH negativo	115
4.5.1.b. Pacientes VIH positivo	115
<b>5. DISCUSION</b>	<b>132</b>
5.1. Datos generales	134
5.2. Elección de los antivirales estudiados	136
5.3. Comparación de los métodos usados	137
5.4. Datos generales de la muestra estudiada	139
5.5. Resultados del estudio de sensibilidad	140
5.6. Estudio de las historias clínicas de los pacientes con aislados de VHS resistentes a aciclovir	144
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>149</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>152</b>

# **1. INTRODUCCION**

## **1.A. INTRODUCCION A LA FAMILIA *HERPESVIRIDAE***

La historia de la virología va paralela a la historia de la humanidad, estando las enfermedades víricas entre las más antiguas reconocidas (ej: rabia, polio, herpes). Sin embargo, la virología como ciencia no comienza hasta los descubrimientos de Ivanovski sobre el virus del mosaico del tabaco en 1892 <sup>36</sup>. Dentro de las enfermedades víricas juegan un papel importante las enfermedades producidas por virus de la familia *Herpesviridae*. Los miembros de la familia *Herpesviridae* son virus grandes, y envueltos, cuyo material nucleico es ADN. Aproximadamente hay 80 herpesvirus conocidos que infecten a seres vivos del reino animal. Se reconocen siete herpesvirus humanos: virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), virus varicela-zoster (VVZ), virus Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HVH-6) y herpesvirus humano 7 (HVH-7). Recientemente se han detectado secuencias de ADN correspondientes a lo que puede ser un nuevo miembro de esta familia en biopsias de lesiones de sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA, a este nuevo agente se le denomina herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi o herpesvirus humano 8 (HVH-8), aunque el papel del HVH-8 está todavía muy discutido. A los cinco primeros virus descritos anteriormente se les denomina también, respectivamente, herpesvirus humano 1, herpesvirus humano 2, herpesvirus humano 3, herpesvirus

humano 4 y herpesvirus humano 5. Existen numerosos herpesvirus que infectan a primates del nuevo y viejo mundo, uno de ellos puede infectar al hombre, aunque en raras ocasiones, se trata del virus herpes B o *Herpesvirus simiae* <sup>108,142,153</sup>.

Los herpesvirus se clasifican en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* sus características principales quedan resumidas en la tabla I.

**TABLA I:** Características principales de los miembros de la familia *Herpesviridae* de importancia clínica.

Nombre común	Otra denominación	Subfamilia	Tamaño del genoma (kpb x 10 <sup>6</sup> )	Contenido de Guanina-Citosina (%)
<u>Virus humanos</u>				
Virus herpes simplex tipo 1	Herpesvirus humano 1	$\alpha$	152	67
Virus herpes simplex tipo 2	Herpesvirus humano 2	$\alpha$	152	69
Virus varicela-zoster	Herpesvirus humano 3	$\alpha$	125	46
Virus Epstein-Barr	Herpesvirus humano 4	$\gamma$	172	59
Citomegalovirus	Herpesvirus humano 5	$\beta$	229	57
Herpesvirus humano 6		$\gamma$	165	43
Herpesvirus humano 7		$\gamma$	aprox 145	aprox 42
Herpesvirus humano 8	Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi	--	--	--
<u>Virus de simios</u>				
Virus herpes B	<i>Herpesvirus simiae</i>	$\alpha$	aprox 150	74

En lo relativo a su estructura, se trata de virus grandes (150-250 nm) compuestos, de fuera hacia dentro, por una cubierta externa, el tegumento, la nucleocápside y un core interno compuesto por proteínas y el genoma viral. La cubierta externa o envuelta está derivada de porciones de las membranas nucleares y citoplasmáticas de las células previamente infectadas; en el proceso de replicación las glicoproteínas virales que fueron insertadas en las membranas de la célula se recuperan y finalmente aparecen proyectadas hacia el exterior de la cubierta externa de los herpesvirus <sup>108</sup>.

Las glicoproteínas de las cubiertas de los herpesvirus tienen una serie de funciones, no todas ellas conocidas. Así, por ejemplo, se sabe que las glicoproteínas B, D, H y L de los virus herpes simplex tipos 1 y 2 son responsables de la unión y penetración de las partículas víricas en las células <sup>20,71,77,121</sup>. Otras, como las glicoproteínas E de estos mismos virus (VHS 1 y 2) son receptores Fc, mientras que la glicoproteína C tiene actividad de unión al fragmento C3b del complemento <sup>65</sup>. Los anticuerpos frente a estas glicoproteínas normalmente neutralizan la infectividad del virus, presumiblemente por interferencia con los receptores de unión del virus con la célula <sup>121</sup>.

El tegumento del virión consiste en un ensamblaje aparentemente amorfo de una o más proteínas codificadas por los virus que, para algunos

herpesvirus, sirve para iniciar el ciclo replicativo en células susceptibles <sup>153</sup>.

La nucleocápside de los herpesvirus mide aproximadamente 100 nm de diámetro y está formada por 162 capsómeros proteicos en una disposición icosapentahédrica. La nucleocápside se sitúa englobando el ADN viral, que en todos los herpesvirus es una molécula de ADN lineal y bicatenario. El ADN de los herpesvirus está organizado según varios patrones complicados dependiendo del número relativo, tamaño y posición de secuencias de repetición. En el caso del VHS, se trata de una sola región flanqueada por secuencias de repetición <sup>108,153</sup>.

La replicación de los herpesvirus es un proceso cuidadosamente regulado y con múltiples pasos. Poco tiempo después de la infección, se transcribe un número pequeño de genes. Estos genes "inmediato-tempranos" codifican proteínas que regulan su propia síntesis y estimulan la síntesis de una segunda ola de proteínas codificadas en los genes "tempranos" del virus. Como se ha dicho antes, en algunos herpesvirus, esta transcripción de genes "inmediato-tempranos" está estimulada por proteínas del tegumento en algunos miembros de esta familia de virus. Las proteínas "tempranas" de los herpesvirus están implicadas en la replicación genómica. Dentro de estas, las mejor caracterizadas son las desoxipirimidin (timidin) quinasas, ADN polimerasas, ribonucleótido reductasas y exonucleasas. La forma precisa por la cual se replica el ADN de los

herpesvirus no se conoce, pero la presencia de secuencias de repetición terminales puede implicar que en el proceso el ADN se circulariza. Hay evidencias de que algunos herpesvirus generan los ADN de la progenie mediante un mecanismo de enrollamiento <sup>12,88</sup>.

Después de la replicación del ADN se expresan la mayoría de los genes de los herpesvirus. Los productos de estos genes "tardíos" se incorporan en los viriones hijos o bien ayudan en su ensamblaje. Las nuevas partículas salen de la célula huésped y rápidamente infectan a células susceptibles contiguas. La forma predominante de expansión de los herpesvirus en el organismo es célula a célula, ya que no se acumulan virus libres <sup>153</sup>.

En lo relativo al tropismo de los herpesvirus, éstos varían enormemente en su capacidad de infectar diversos tipos de células, hecho que sirve para diferenciarlos en diversas subfamilias. En el caso de los VHS crecen bien en células epiteliales y fibroblastos de hombre, mono, conejo, ratón y muchas otras especies animales. Este no es el caso, por ejemplo del CMV, que crece bien sólo en fibroblastos humanos, o del VEB, que crece sólo en linfocitos B, o del HVH 6 que crece sólo en linfocitos T CD4+ . Pero la importancia de esto no es sólo taxonómica ya que puede ser altamente predictivo del tipo de tejido que van a infectar en sus presentaciones clínicas, de tal manera que las infecciones por herpesvirus que se replican



en tejido de origen epitelial van a ser predominantemente infecciones mucocutáneas <sup>64,153</sup>.

El proceso denominado de latencia no se conoce totalmente, aunque es un hecho que ocurre en todos los miembros de la familia. El material genético de los VHS se queda de forma extracromosómica tras haber producido una infección <sup>107</sup>. Tradicionalmente ha habido gran discusión sobre si los genomas de los herpesvirus permanecían inactivos o si se expresaban genes durante el periodo de latencia. Según varios estudios, en el caso de los VHS en la infección latente existe una importante expresión de genes seleccionados. El estudio de estos genes indica que parecen ser genes implicados en la regulación del virus y que permiten al virus mantenerse en estado de latencia o mantenerse en estado de alerta para posibles reactivaciones <sup>153</sup>.

Otro atributo biológico de los *Herpesviridae* es la capacidad de la mayoría de ellos de transformar células. Esta capacidad se ha demostrado sólo en modelos de laboratorio. El caso de la capacidad transformadora de células por VHS-1, VHS-2 y CMV parece que no tiene apenas implicación clínica. Sin embargo, en el caso de los virus linfotróficos, se ha demostrado que son tumorgénicos, provocando la mayoría de ellos enfermedades linfoproliferativas. Este es el caso del VEB, que está asociado con el carcinoma nasofaríngeo y otros carcinomas poco frecuentes<sup>97,157</sup>.

En lo relativo a su epidemiología y transmisión, los herpesvirus son virus frágiles que no sobreviven largo tiempo en el medio ambiente. Debido a esta característica, la transmisión generalmente requiere la inoculación en una persona sin infección previa de un fluido con virus de una persona infectada directamente en tejido susceptible de ser infectado por estos virus. Estos lugares susceptibles son las mucosas oral, ocular, genital o anal, el tracto respiratorio y el torrente sanguíneo. Los herpesvirus son incapaces de atravesar piel queratinizada de manera eficaz <sup>119,165</sup>.

En la tabla II se indican los principales mecanismos de transmisión de los herpesvirus.

Los herpesvirus son ubicuos, por lo que infectan prácticamente a toda la población. Los herpesvirus se transmiten a partir individuos en los que el virus está replicándose, bien durante una primoinfección o bien en reactivaciones. Algunas de las personas que transmiten el virus tienen un episodio sintomático, pero la mayoría están pasando un periodo asintomático <sup>153</sup>. La probabilidad de que ocurra la transmisión depende en gran medida de la cantidad de virus eliminada. La conclusión de la mayoría de los estudios es que tanto las infecciones sintomáticas como las asintomáticas contribuyen sustancialmente a las tasas de transmisión de herpesvirus. Los datos más fiables proceden de los estudios sobre el herpes genital, entre la mitad y tres cuartas partes de las infecciones genitales por

**TABLA II:** Principales mecanismos de transmisión de los virus miembros de la familia *Herpesviridae*.

VIRUS	Formas de transmisión				Seroprevalencia (%) en EEUU <sup>80</sup>		Grupos o actividades con mayor riesgo de infección
	PERINATAL	SANGRE	CONTACTO INTIMO	AEROSOL	Niños sanos	Adultos sanos	
VHS-1	+	-	+	-	20-40	50-70	Contacto íntimo frecuente
VHS-2	+	-	+	-	0-5	20-50	Contacto íntimo frecuente
VVZ	+	-	+	+	50-75	85-95	Guarderías
CMV	+	+	+	-	10-30	40-70	Guarderías Promiscuidad homosexual Transplantados y receptores de transfusión de sangre
VEB	+	+	+	-	10-30	60-90	Contacto íntimo frecuente
HVH-6	¿?	¿?	¿?	¿?	80-100	60-100	Estados de inmunodeficiencia celular
HVH-7	¿?	¿?	¿?	¿?	40-80	60-100	¿?
Virus Herpes B	¿?	-	-	-	0	< < 1	Cuidadores de monos

+: bien asociado, -: poco asociado, ¿?: datos insuficientes

VHS-1: Virus herpes simplex tipo 1; VHS-2: Virus herpes simplex tipo 2; VVZ: Virus varicella-zoster; CMV: citomegalovirus; VEB: Virus Epstein-Barr; HVH-6: Herpesvirus humano 6; HVH-7: herpesvirus humano 7

VHS se adquieren de parejas sexuales asintomáticas. Es bastante probable que una proporción incluso mayor de infecciones por VEB se transmitan asintomáticamente <sup>19</sup>.

La patogénesis de las infecciones por herpesvirus se puede explicar por tres mecanismos diferentes: 1) por destrucción directa de tejido; 2) por provocar respuestas inmunopatológicas; 3) por facilitar la transformación neoplásica <sup>153</sup>.

La infección mucocutánea por VHS es un claro ejemplo de

destrucción de tejido infectado. Algunas complicaciones de las infecciones por herpesvirus, como el eritema multiforme, la anemia hemolítica y la trombocitopenia son consecuencia de la respuesta inmune. A pesar de que algunos linfomas de células B y el carcinoma nasofaríngeo se hayan asociado a la infección por VEB, todavía no está esclarecido el papel del virus en la génesis neoplásica <sup>157</sup>.

El diagnóstico de la mayoría de las infecciones por herpesvirus se realiza clínicamente, pero existen situaciones graves en las que se necesitan pruebas específicas. La confirmación por el laboratorio de una infección por un herpesvirus puede ayudar a excluir otras infecciones clínicamente similares, eliminando incertidumbre, ayudando al tratamiento y puede ser usada para la detección de cepas resistentes a fármacos <sup>6</sup>.

Un ejemplo práctico del valor de una prueba de confirmación es en el herpes genital, en cuyo caso se podrían recomendar modificaciones de conducta y tratamiento con aciclovir. Otro ejemplo son las erupciones zosteriformes, frecuentemente diagnosticadas como brotes recurrentes de zóster, cuando lo que son muchas veces es infecciones por VHS <sup>91</sup>

Los herpesvirus causan una gran variedad de síndromes clínicos. Los principales quedan resumidos en la tabla III.

**TABLA III: Principales síndromes clínicos causados por miembros de la familia *Herpesviridae*.**

Síndrome	VHS-1	VHS-2	VVZ	VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VH B
Gingivostomatitis	+	+						+
Lesiones genitales	+	+	+					+
Lesiones cutáneas	+	+	+					+
Queratoconjuntivitis	+	+	+					+
Retinitis	+			+	+			
Esofagitis	+	+	+	+				
Neumonitis	+	+	+	+	+	+		
Hepatitis	+	+	+	+	+			
Pericarditis			+	+	+			
Meningitis		+	+					
Encefalitis	+	+	+	+	+	+		+
Mielitis	+	+	+	+	+			+
Eritema multiforme	+	+	+					+
Otros exantemas				+	+	+	+	
Artritis			+		+			
Anemia hemolítica			+	+	+			
Leucopenia			+	+	+			
Trombocitopenia			+	+	+			
Mononucleosis				+	+	+		
Linfoma					+			

Respecto a la prevención y tratamiento de las infecciones producidas por miembros de la familia *Herpeviridae*, se ha avanzado mucho en la última década. Existe una vacuna para varicela-zoster pendiente de autorización, y hay numerosos estudios sobre inmunoglobulinas específicas anti-CMV para prevenir infecciones graves en inmunodeprimidos <sup>153</sup>. El aciclovir es el principal fármaco antiviral usado hoy en día y tiene numerosas aplicaciones para el tratamiento de infecciones herpéticas mucocutáneas y viscerales <sup>44,168</sup>. El ganciclovir, un análogo del aciclovir, aunque más tóxico, es utilizado en el tratamiento de infecciones graves por CMV en pacientes inmunodeprimidos <sup>74,109</sup>. Otro fármaco en uso hoy día es el foscarnet, siendo su principal utilización el tratamiento de infecciones por herpesvirus resistentes a aciclovir y ganciclovir <sup>67,131,134,135</sup>. Desde hace poco tiempo hay otro nuevo antiviral, el famciclovir, que tiene actividad principalmente frente a varicela-zoster y frente a herpes simplex; también parece que es activo frente al virus de la hepatitis B <sup>13,14,144,160,161</sup>.

## **1.B. INFECCION POR VIRUS HERPES SIMPLEX**

Las infecciones por el virus herpes simplex (VHS) se encuentran entre las infecciones que más comúnmente afectan al hombre desde la antigüedad. Ya Hipócrates describió el *Herpes labialis*. La primera descripción del herpes genital, realizada en 1736, se atribuye a Astruc, médico del rey de Francia. Entre 1910 y 1920 se demostró la naturaleza infecciosa de las lesiones herpéticas al producir lesiones en las córneas de ratones con material de queratitis herpética y de *Herpes labialis*<sup>80, 170</sup>. Los diversos estudios realizados en los últimos años han ayudado a entender la biología molecular del VHS, sus mecanismos de latencia y recurrencia, así como a lograr los primeros fármacos útiles en determinadas infecciones por VHS.

### **1.B.1. Descripción del agente.**

El virus herpes simplex (*Herpesvirus hominis*), comparte muchas propiedades con otros miembros de su familia, que como ya se ha indicado, en humanos incluye, aparte del VHS, varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y los herpesvirus humanos tipos 6, 7 y 8. Los miembros de este grupo tienen un core interno con ADN bicatenario, una cápside icosaédrica con 162 capsómeros y una membrana lipídica o envuelta. El diámetro de los herpesvirus oscila entre 150 y 200 nm. La replicación vírica

ocurre principalmente en el núcleo celular y se completa con la adición de proteínas de la envuelta al pasar a través de la membrana nuclear. La replicación completa del virus está asociada con lisis celular. Todos los miembros de la familia *Herpesviridae* son capaces de establecer un estado de latencia en el interior de algunas de las células que infectan <sup>4,80,108</sup>.

Se ha subdividido el VHS en dos subtipos, VHS-1 y VHS-2. Las diferencias entre estos dos subtipos son principalmente clínicas y epidemiológicas, aunque también se encuentran algunas diferencias bioquímicas y biológicas <sup>4,80</sup>. Las diferencias antigénicas entre VHS-1 y VHS-2 se pueden detectar por una gran variedad de métodos serológicos, entre los que se incluyen inmunofluorescencia, microneutralización y ELISA. Se pueden detectar diferencias genómicas mediante análisis del ADN de los aislados.

Las principales diferencias entre VHS-1 y VHS-2 se resumen en la tabla IV.



**TABLA IV:** Diferencias entre VHS-1 y VHS-2 <sup>56</sup>

CARACTERISTICAS	VHS-1	VHS-2
Infecciones urogenitales	- (10-30%)	+ (70-90%)
Infecciones no genitales:		
- Labial	+ (80-90%)	- (10-20%)
- Queratitis	+	-
- Panadizo (manos)	+	-
- Encefalitis (adulto)	+	-
Infección neonatal	- (aprox. 30%)	+ (aprox. 70%)
Transmisión	No genital	Genital
Focos en monocapas de embrión de pollo	-	+
Sensibilidad a temperatura (40°C)	-	+
Sensibilidad a heparina	+	-
Formación de sincitios en células embrionarias de riñón humano	-	+

### 1.B.2. Epidemiología.

Los virus herpes simplex tienen una distribución mundial. No se conoce ningún vector animal para VHS y, a pesar de que es fácil infectar

a animales de experimentación, parece que el hombre es el único reservorio. La principal forma de transmisión es el contacto directo con las secreciones infectadas. El VHS-1 se transmite principalmente mediante contacto con secreciones orales contaminadas, y el VHS-2, por contacto con secreciones genitales contaminadas. La transmisión puede ocurrir a partir de personas con infección manifiesta o bien con infección subclínica, si bien los títulos de VHS en las secreciones de personas con infección subclínica son menores, siendo la transmisibilidad menor que en el caso de las infecciones manifiestas. Dependiendo de la población estudiada, aproximadamente el 0,65-15 por ciento de la población puede encontrarse excretando VHS en un momento determinado <sup>167</sup>.

No parece que haya una variación estacional o de sexo en la incidencia de infección por VHS, pero en diversos estudios se ha visto que la tasa de infección por VHS-2 es mayor en la raza negra, y en personas solteras, de bajo nivel socioeconómico o pacientes con historia de otras enfermedades de transmisión sexual. Los patrones de edad en VHS-1 y VHS-2 son diferentes. En el caso del VHS-1, los anticuerpos aumentan rápidamente durante la infancia, de forma que en la pubertad prácticamente todos los miembros de clases socioeconómicas bajas han sido infectados. Sin embargo, el periodo en el que se produce un aumento de infecciones por VHS-2 es el siguiente a la pubertad y está relacionado con la actividad sexual. La frecuencia de anticuerpos frente a VHS-2 en adultos varía entre

el 3% encontrado en monjas y el 70% en prostitutas <sup>4,80</sup>.

La presencia de VHS-1 en localizaciones diferentes a las habituales es más frecuente en diversos grupos como dentistas, personal de unidades de cuidados intensivos y luchadores <sup>11,167</sup>. En el caso del VHS-2, la infección no genital puede ocurrir en niños nacidos de madres con infección genital. Las infecciones anales y perianales por VHS-2 son frecuentes en homosexuales sexualmente activos <sup>80</sup>. La autoinoculación desde zonas genitales a otros puntos (manos, glúteos, piernas) no es un hecho raro. El riesgo de padecer una infección por VHS-2 de transmisión heterosexual es mayor en mujeres que en hombres, y haber padecido previas infecciones por VHS-1 reduce el riesgo de padecer infecciones por VHS-2 <sup>19,110</sup>.

Las infecciones recurrentes ocurren de manera frecuente en ambos serotipos. La mayoría de las infecciones recurrentes se deben a una reactivación del virus endógeno y no a una infección por un virus exógeno, y ocurren a pesar de la presencia de anticuerpos circulantes. La tasa de recurrencia en herpes labiales y periorales es aproximadamente del 20 al 40% de la población <sup>80</sup>. Los herpes labiales causados por VHS-2 recurren en mayor medida que los causados por VHS-1 <sup>94</sup>. Las recurrencias varían en frecuencia desde una al mes (5-25 %) hasta menos de una cada seis meses (10-65 %). Los factores desencadenantes pueden variar dependiendo de la persona, entre ellos se encuentran exposición al sol,

fiebre, traumatismos locales, manipulación del nervio trigémino, menstruación o tensión emocional. La queratitis recurrente por VHS es menos frecuente, se ha estimado que en los Estados Unidos de América, el 5% de los pacientes de clínicas oftalmológicas tienen infecciones oculares por VHS, de estos, entre el 25 y 50 % tienen una recurrencia al cabo de dos años <sup>80</sup>. La frecuencia de herpes genitales recurrentes depende de muchos factores, entre los que se encuentran: sexo, serotipo del VHS y la presencia y título de anticuerpos neutralizantes; así, las lesiones genitales por VHS-1 recurren menos frecuentemente que las producidas por VHS-2, y las recurrencias son más frecuentes en hombres que en mujeres <sup>167</sup>.

### **1.B.3. Patogénesis**

El VHS, una vez ha llegado a la piel, penetra en las células epiteliales parabasales e intermedias. Hay estudios en donde se indica que el VHS penetra en las células mediante un proceso fagocítico <sup>39</sup>, pero actualmente está aceptado que la penetración infecciosa del VHS ocurre mediante un proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de las células independiente del pH <sup>121</sup>. Como resultado de la multiplicación del VHS, se produce la lisis de las células infectadas y la formación de una respuesta inflamatoria local. Esto provoca la aparición de las lesiones típicas

de las infecciones por VHS, que son vesículas con fina membrana sobre una base inflamatoria. Estas lesiones son indistinguibles de las producidas por el virus varicela-zoster. También se observa una implicación de los nódulos linfáticos que drenan el lugar de la primoinfección. Dependiendo del estado inmunitario del paciente, la infección puede evolucionar hacia viremia y diseminación visceral con implicación de varios órganos principalmente hígado, pulmón y sistema nervioso central <sup>80</sup>.

Después de la primoinfección, se establece un estado de latencia del virus en los ganglios sensoriales. Una vez dentro del ganglio se puede detectar ADN viral y algunas copias de ARNm dentro de las neuronas <sup>140</sup>. El mecanismo por el cual se establece la latencia, así como las posteriores reactivaciones no se conoce, aunque existen varias teorías inmunológicas y bioquímicas, que todavía permanecen sin demostrarse <sup>30,80,140,151</sup>. El virus reactivado se expande por los nervios sensitivos. Las neuronas son las únicas células con la propiedad de no lisarse en la producción de virus completos. Es posible que en la neurona sólo se produzcan productos tempranos del virus y que el ensamblaje completo del virus ocurra en las células epiteliales. Una vez que el VHS ha llegado a células epiteliales, éste se expande célula a célula y la limitación de la expansión es resultado de la actuación de los mecanismos de inmunidad humoral y celular, y se postula que por la producción local de interferón <sup>99</sup>.

En el hombre se ha demostrado la latencia en los nervios trigémino, vago y sacro. Un hecho curioso es que no todas las áreas inervadas por un nervio con infección latente están igualmente involucradas y las recurrencias habitualmente ocurren en la cercanía del lugar de las infecciones previas<sup>80</sup>. Se ha demostrado que hay una región en el genoma del VHS, denominada LAT (*latency-associated transcript*), que debe ser diferente en el VHS-1 y en el VHS-2 y que es la responsable de que la mayoría de VHS-1 se reactiven a partir de virus latentes en el nervio trigémino dando lugar a infecciones recurrentes oculares y orofaciales, y de que la mayoría de VHS-2 lo hagan a partir de virus latentes en el nervio sacro, dando lugar a infecciones recidivantes genitales<sup>172</sup>.

En las primoinfecciones y recurrencias de las infecciones por VHS están involucrados una variedad de mecanismos de inmunidad humoral y celular. Entre estos se encuentran la producción de diversos tipos de anticuerpos, la producción de interferón, la activación de los macrófagos, la inducción de reactividad mediada por linfocitos T, el desarrollo de células *natural killer* y citotoxicidad dependiente de linfocitos. La influencia relativa de todos estos factores (y probablemente otros muchos) no está clara por el momento.

## **1.B.4. Manifestaciones clínicas**

### **1.B.4.1. Primoinfección:**

La primoinfección por VHS-1 es generalmente asintomática, aunque puede presentarse como gingivoestomatitis y faringitis especialmente en niños menores de 5 años y ocasionalmente en adultos. El periodo de incubación oscila entre 2 y 12 días, tras el cual aparece fiebre y dolor de garganta con edema faríngeo y eritema. Al poco tiempo, se desarrollan pequeñas vesículas en la mucosa oral y faríngea, que rápidamente se ulceran y aumentan en número, generalmente involucrando el paladar blando, la mucosa bucal, lengua y suelo de la boca. Las encías se presentan delicadas y sangran fácilmente, y las lesiones se puede extender hacia los labios y resto de mucosa bucal. La fiebre puede estar presente durante muchos días y el paciente normalmente se queja de dolor intenso de boca. El aliento es fétido y hay adenopatía cervical. Teniendo en cuenta la edad, hay que hacer un diagnóstico diferencial con faringitis estreptocócica o diftérica, herpangina, estomatitis aftosa, síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad de Vincent y mononucleosis infecciosa, aunque generalmente no ofrece problemas diagnósticos en niños. La enfermedad dura unos 10-14 días, tras lo cual cura sin dejar secuelas, aunque la adenopatía cervical puede persistir varias semanas. Puede producirse una autoinoculación en los dedos o en otras localizaciones, especialmente en niños pequeños <sup>142</sup>.

Las infecciones herpéticas oculares están producidas generalmente por VHS-1. La primoinfección ocular se puede manifestar como conjuntivitis folicular unilateral con adenopatía regional y/o blefaritis con vesículas herpéticas en el borde del párpado. Puede existir fotofobia, quemosis, lagrimeo excesivo y edema parpebral. Si la infección se limita a la conjuntiva, la curación ocurre tras 2-3 semanas. Sin embargo, si hay síntomas y signos de implicación estromal, la curación se verá retrasada. Normalmente la curación espontánea de conjuntiva y córnea es completa

29 .

Las primoinfecciones genitales por VHS son más frecuentes en adolescentes y en adultos jóvenes, y normalmente producidas por VHS-2 (en el 70-90% de los casos). El periodo de incubación es de 2 a 7 días. En hombres las lesiones vesiculares aparecen generalmente en el glande o en el prepucio. En la mujer, las lesiones pueden afectar la vulva, perineo, glúteos, cérvix y vagina, y generalmente van acompañadas de exudado vaginal. Pueden aparecer lesiones extragenitales en el 10-20% de los pacientes. La primoinfección, en ambos sexos, puede presentarse con fiebre, malestar, anorexia y adenopatía inguinal bilateral. En el hombre las lesiones vesiculares pueden persistir varios días, pero en la mujer se ulceran rápidamente y se recubren por un exudado gris blanquecino. La implicación de la uretra puede traer consigo disuria o retención urinaria. La radiculomielitis sacra herpética puede acompañar a la infección genital y dar



lugar a retención urinaria y neuralgias, observándose en algunos de estos pacientes una pérdida del tono anal y disminución del reflejo bulbocavernoso. Las lesiones pueden persistir un tiempo antes de la curación total. Una infección previa por VHS-1 puede reducir la gravedad y duración del cuadro producido por la infección por VHS-2. En el diagnóstico diferencial de herpes genital se deben tener en cuenta otras enfermedades de transmisión sexual como el chancroide o la sífilis, erosiones secundarias a escoriaciones, manifestaciones genitales del síndrome de Behçet o de eritema multiforme, y candidosis local <sup>80</sup>.

Aunque las primoinfecciones por VHS son generalmente periorales, oculares o genitales, cualquier otro lugar de la piel es susceptible de ser infectado. Así, las primoinfecciones herpéticas pueden ser extensas y mimetizar al herpes zoster. Primoinfecciones en dedos (panadizo) pueden ser confundidas con paroniquia piogénica. La primoinfección herpética anal o perianal es más frecuente en homosexuales tanto hombres como mujeres. El principal síntoma es dolor, picor, tenesmo y exudado. Pueden aparecer síntomas sistémicos de fiebre, escalofríos, malestar, cefalea, disuria y parestesias sacras. En el examen, se ven vesículas y ulceraciones en la zona perianal y anal, que pueden ser confluentes y resultar en una lesión ulcerosa grisácea rodeada por mucosa roja edematosa. Normalmente se acompaña de adenopatía inguinal. El curso es habitualmente autolimitado, a menos que ocurran sobreinfecciones bacterianas. Sin embargo, en

pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la proctitis herpética así como otras manifestaciones cutáneas de infección por VHS pueden ser prolongadas y progresivas <sup>141</sup>.

#### 1.B.4.2. Infecciones recurrentes:

El herpes labial recurrente está casi siempre precedido por síntomas prodrómicos (dolor, quemazón o picor) que duran generalmente menos de 6 horas, pero que en algunos casos pueden durar entre 24 y 48 horas. Las vesículas suelen aparecer en el borde externo de los labios y están normalmente acompañadas de dolor. El tamaño de la lesión es generalmente menor de 10 mm y las lesiones evolucionan de vesícula a úlcera/costra en 48 horas aproximadamente. El dolor suele ser más intenso en las 24 horas siguientes a la aparición de vesículas. La curación ocurre al cabo de unos 8-10 días. De manera más rara pueden aparecer recurrencias en boca, nariz, barbilla o región perioral <sup>80</sup>.

La infección ocular puede recurrir como queratitis, blefaritis o queratoconjuntivitis. La queratitis recurrente es normalmente unilateral, sólo en un 2-6% de los casos es bilateral. Se pueden presentar dos tipos de queratitis: ulceración dendrítica o implicación del estroma. Las ulceraciones dendríticas son fácilmente detectables por el oftalmólogo con fluoresceína, normalmente hay pérdida de sensibilidad corneal. La agudeza visual puede

estar disminuida si las úlceras están presentes en la porción pupilar de la córnea. La queratitis superficial normalmente se cura, pero nuevas recurrencias pueden provocar una implicación profunda del estroma y uveítis, lo que puede estar mediado en parte por una reacción de hipersensibilidad a antígenos virales o de células alteradas. Con sucesivas recurrencias se puede producir una pérdida gradual de visión, los brotes pueden durar hasta meses con la formación de cicatrices profundas, estrechamiento de la córnea y neovascularización. Puede llegar a producirse pérdida total de la visión e incluso ruptura del globo ocular <sup>142</sup>.

Las lesiones genitales recurrentes, en ambos sexos, están generalmente asociadas con una sintomatología sistémica menos intensa y con una implicación local menos extensa que en las primoinfecciones. Normalmente aparece varias horas antes de la recurrencia un prodromos de malestar en la zona, picor y quemazón. En la mujer las lesiones se localizan principalmente en los labios menores, labios mayores y perineo <sup>75</sup>, y en los hombres en el glande y prepucio. La curación ocurre en 6-10 días. La eliminación de virus va disminuyendo más lentamente en la mujer y puede ocurrir entre dos recurrencias en ambos sexos <sup>80</sup>.

Se pueden desarrollar recurrencias por VHS-1 y VHS-2 en las extremidades, ocasionalmente asociadas con gran neuralgia, edema local y linfangitis <sup>80</sup>.

#### 1.B.4.3. Complicaciones de la infección por VHS:

**1.B.4.3.A. Encefalitis:** la encefalitis por VHS es una complicación rara de la infección herpética, aunque es una de las infecciones víricas esporádicas del cerebro más comunes en Estados Unidos. Su frecuencia estimada es de 1/250 a 1/500.000 por año. El serotipo normalmente implicado en estos casos es el VHS-1.

La encefalitis herpética puede ocurrir a cualquier edad, en ambos sexos y en cualquier estación del año. El curso clínico puede comenzar de manera repentina o tras un periodo prodrómico similar a una gripe. Los síntomas más habituales son cefalea, fiebre, alteración del comportamiento, dificultad de hablar, alteraciones focales y alucinaciones olfatorias. El líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta normalmente una pleocitosis con monocitos y neutrófilos, proteínas ligeramente elevadas y glucosa normal o ligeramente disminuida. Normalmente no se encuentran virus infecciosos en el LCR durante la encefalitis infecciosa, siendo una biopsia cerebral la muestra idónea para el diagnóstico histológico y microbiológico. Con el fin de obtener un diagnóstico rápido, se han usado últimamente técnicas de PCR en LCR de pacientes con encefalitis herpética<sup>8</sup>. La encefalitis por VHS debe ser distinguida de otras encefalitis víricas, meningitis tuberculosa y fúngicas, abscesos cerebrales, accidentes cerebrovasculares y tumores de cerebro. El curso en un paciente sin tratamiento es un deterioro rápido en varios días que progresa hacia coma y finalmente la muerte. La mortalidad

en casos demostrados con biopsia no tratados es del 60 al 80%, y menos del 10% de pacientes quedan sin ningún tipo de secuela <sup>80</sup>.

**1.B.4.3.B. Infecciones congénitas y neonatales:** la infección por VHS del neonato puede ser desde una infección localizada sin complicaciones hasta una infección diseminada de resultado fatal. La incidencia de infección neonatal por VHS se ha estimado entre 1 cada 200 y 1 cada 10.000 nacidos vivos y es mayor en niños prematuros que en no prematuros <sup>17,18</sup>. La mayoría de las infecciones provienen de una diseminación retrógrada del VHS-2 secundaria a una infección genital materna o bien por el paso del niño por el tracto genital materno infectado en el momento del parto <sup>28</sup>.

La infección congénita puede ser reconocida tras el parto por ictericia, hepatoesplenomegalia, diátesis sangrante, anomalías del SNC como microcefalia o microftalmia, irritabilidad, inestabilidad de temperatura corporal, coriorretinitis, y vesículas en la piel. Si no se presentan vesículas, la infección congénita por VHS puede confundirse con infecciones por rubeola, CMV o *Toxoplasma*. Por el contrario, la infección neonatal aparece días después del nacimiento y puede mimetizar a la sepsis neonatal. Las vesículas pueden o no estar presentes, y la primera anomalía observada suele ser conjuntivitis. Suele haber síntomas neurológicos llegando hasta letargia y coma. En el LCR se observa un aumento de las proteínas mientras que la glucosa permanece normal. Algunos niños se curan sin secuelas,

pero lo normal es que se desarrollen secuelas significativas, como encefalitis destructiva o coagulación intravascular diseminada <sup>15</sup>. La mortalidad en infecciones herpéticas neonatales diseminadas sin tratamiento es del 85% aproximadamente. La infección localizada en piel, ojos o boca no tiene prácticamente ninguna mortalidad, pero si se presentan muchas recurrencias en los primeros 6 meses de vida puede ser sugerente de implicaciones neurológicas <sup>28</sup>.

**1.B.4.3.C. Infección en el paciente inmunocomprometido:** los pacientes inmunocomprometidos tienen gran riesgo de padecer infecciones graves por VHS <sup>80</sup>.

Los transplantados renales, cardíacos o de médula ósea excretan VHS-1 por faringe durante las primeras semanas tras el trasplante. Normalmente estas infecciones son asintomáticas, pero en algunos casos pueden ser particularmente graves y persistir durante semanas e incluso meses, afectando los tractos respiratorio o digestivo provocando traqueobronquitis, neumonía, esofagitis o hepatitis <sup>85,93,127</sup>. Parece que estas infecciones graves están relacionadas con la inmunosupresión yatrogénica a la que están sometidos estos pacientes. Los pacientes con neoplasias o con alteraciones tímicas son también susceptibles de padecer infecciones graves por VHS <sup>80</sup>.

La infección grave por VHS es un hecho importante en pacientes con SIDA. Se han observado diferentes infecciones por VHS en pacientes infectados por el VIH, entre las que destacan: úlceras progresivas perianales, colitis, esofagitis, neumonía y un gran número de trastornos neurológicos. Además, el herpes genital puede ser un factor de riesgo más para la adquisición del VIH. Un hecho importante, especialmente en pacientes con SIDA, es la aparición de infecciones por VHS que no remiten con el tratamiento con aciclovir <sup>25,132</sup>. La importancia de este hecho, que acaba con el único tratamiento eficaz para estas infecciones y que amenaza con la posibilidad de extenderse en primer lugar a otros inmunodeprimidos <sup>115</sup> y luego al resto de la población ha sido lo que ha provocado la realización de estudios sobre la sensibilidad de VHS a agentes antivirales y sobre mecanismos de resistencia, entre los que se encuentra esta tesis.

**1.B.4.3.D. Posible asociación de la infección genital por VHS-2 con el carcinoma cervical:** parece que el VHS-2 está implicado en la formación de carcinoma cervical en la mujer. El principal agente infeccioso asociado con este carcinoma es el papilomavirus humano (PVH), pero existen otros factores infecciosos como CMV, herpesvirus humano 6, VIH y VHS-2 <sup>16,46</sup>. Un estudio epidemiológico reciente sugería que existía una interacción biológica entre el PVH-16 o PVH-18 y el VHS-2 durante el desarrollo de carcinoma cervical <sup>87</sup>. Existen otros estudios que asocian la infección por VHS-2 con el carcinoma cervical en la mujer <sup>31,92,117</sup>, aunque también

existen otros que no encuentran dicha asociación <sup>16,48,76</sup>. A pesar de que los estudios existentes no son concluyentes en la asociación de VHS-2 con carcinoma cervical, existe evidencia de que el VHS-2 tiene el potencial de comportarse como factor de riesgo asociado para el desarrollo de carcinoma cervical <sup>87</sup>.



## **1.C. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES POR VIRUS**

### **HERPES SIMPLEX**

El método estándar para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por VHS es el aislamiento del virus en cultivo celular. El VHS provoca un efecto citopático (ECP) evidente en numerosas líneas celulares disponibles. En la mayoría de los cultivos positivos, el ECP aparece entre 24 y 96 horas después de inocular la línea celular. Actualmente se han desarrollado métodos de detección del crecimiento basados en técnicas inmunológicas o de detección de ADN con el fin de acortar el tiempo requerido para detectar la presencia de VHS en la muestra mediante cultivo celular.

La existencia de VHS en una lesión, se puede poner de manifiesto examinando los cambios histoquímicos producidos en las células infectadas o bien visualizando con microscopía electrónica las partículas víricas. Hoy día existen numerosos métodos para detectar antígenos o ADN mediante anticuerpos monoclonales o hibridación, respectivamente. La sensibilidad de todos los métodos depende del estado de la lesión (es mayor en lesiones vesiculares que ulcerativas), de si se trata de una primoinfección o no (más sensibles en éstas), o de si la muestra es de un paciente inmunodeprimido o no (en los pacientes inmunodeprimidos la carga viral es mayor) <sup>6</sup>.

El diagnóstico de una primoinfección puede establecerse demostrando una seroconversión o un aumento del título de anticuerpos entre los sueros de la fase aguda y de convalecencia. Sin embargo, se estima que sólo en el 5% de los pacientes con herpes mucocutáneos recurrentes se obtiene un aumento igual o mayor de 4 veces del título de anticuerpos entre las muestras de estas dos fases <sup>32</sup>. Por tanto, el diagnóstico serológico tiene poco valor en el caso de los herpes mucocutáneos recurrentes; actualmente las técnicas serológicas se utilizan para identificar pacientes que han padecido una infección por VHS en el pasado <sup>6</sup>.

Las técnicas para el diagnóstico de infecciones por VHS, se pueden dividir en tres grandes grupos dependiendo de la forma de abordar este diagnóstico:

1. Examen directo del material de las lesiones herpéticas.
2. Aislamiento e identificación del virus.
3. Pruebas serológicas.

#### **1.C.1. Examen directo del material de las lesiones herpéticas.**

##### **1.C.1.1. Microscopía óptica:**

Para detectar las células infectadas por virus, se tiñen las células previamente fijadas, con Giemsa o mediante las tinciones de Wright o

Papanicolau. Las células infectadas se presentan como células con el citoplasma hinchado y aparición de células gigantes multinucleadas.

Estos cambios celulares no son específicos de las infecciones por VHS, sino que pueden ser inducidos por otros virus de la familia *Herpesviridae*, como el VVZ.

Estos métodos de microscopía presentan una sensibilidad de sólo el 50-70% comparados con el cultivo de virus o con métodos de detección de antígenos o ADN <sup>6</sup>.

#### 1.C.1.2. Microscopía electrónica:

Los herpesvirus no presentan problemas de identificación al examinarlos con microscopía electrónica. Sin embargo, las técnicas de microscopía electrónica presentan muchos inconvenientes, ya que necesitan mucho tiempo y no son tan sensibles ni específicas como el aislamiento del virus o la detección de antígenos.

#### 1.C.1.3. Técnicas de inmunofluorescencia:

La técnica más comúnmente usada para la detección directa de VHS en una muestra es la tinción directa mediante inmunofluorescencia o

inmunoperoxidasa <sup>4,30</sup>. Para la obtención de muestras, se debe exponer la base de la lesión, frotarla con una torunda de algodón e inmediatamente hacer una impronta sobre un portaobjetos de cristal. Tras este paso y fijación de la muestra, se realiza la tinción, preferiblemente con anticuerpos monoclonales. Si se usan como conjugado anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (inmunofluorescencia directa), la sensibilidad del método comparada con el cultivo celular, es del 78-88%, con una tasa de falsos positivos baja <sup>73,125,139</sup>. Sin embargo, para garantizar el resultado de las tinciones directas con anticuerpos monoclonales, se debe tener la certeza de que la toma ha sido correcta y de que se ha frotado la base de la lesión con la torunda, ya que si no, pueden aparecer falsos positivos y falsos negativos <sup>4</sup>.

Se han usado otros métodos inmunológicos para detectar antígeno de VHS en muestras clínicas, como ELISA, ensayos de inmunoperoxidasa, hemaglutinación o ensayos con conjugados de avidina-biotina <sup>1,113,120,139,143</sup>, aunque su uso más frecuente es la detección del antígeno tras la obtención de un efecto citopático en cultivo celular. El antígeno viral se puede concentrar pasando el medio por un filtro o con medios de transporte especiales <sup>128</sup>. La sensibilidad de estos métodos, en comparación con el aislamiento de virus en cultivo celular oscila entre el 79 y 95%, con una especificidad del 65-90%.

A pesar de la gran cantidad de métodos basados en técnicas inmunológicas disponibles hoy en día, ninguno de ellos es capaz de detectar con suficiente sensibilidad y especificidad la eliminación asintomática de VHS <sup>4,120,163</sup>.

### **1.C.2. Aislamiento e identificación del virus.**

El aislamiento del virus en cultivo celular es el método más sensible para llevar a cabo el diagnóstico de laboratorio de la infección por VHS, asimismo, el tener al agente causal aislado, permite realizar otras pruebas con el virus, como tipado o determinación de sensibilidad *in vitro*. El VHS crece y forma un efecto citopático en una gran variedad de líneas celulares <sup>4,59</sup>. Se utilizan muy frecuentemente líneas primarias de células embrionarias humanas y líneas diploides humanas, como la línea celular MRC-5, ya que están disponibles comercialmente y también se pueden utilizar para aislar otros virus. Particularmente sensibles para el aislamiento de VHS son las líneas primarias de células de riñón de mono, pulmón de visón (*mink lung*) y de rhabdomyosarcoma <sup>86</sup>. Otras líneas celulares en las que también crece bien son líneas continuas humanas o de primate, como Hep-2 y Vero, que aunque se muestran menos sensibles <sup>4</sup>, son muy utilizadas ya que son líneas muy comunes y cómodas de usar. Generalmente se recomienda inocular la muestra en dos tipos de líneas celulares diferentes con el fin de minimizar las variaciones de sensibilidad de las líneas celulares <sup>21</sup>. Así, en

el Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", se inoculan células MRC-5 y Vero para el aislamiento de VHS. La mayoría de los procedimientos para el cultivo de VHS implican un periodo de adsorción de una hora aproximadamente a 36-37°C antes de cultivarlo con un medio estándar para el cultivo celular como es el medio mínimo esencial de Earle (EMEM) suplementado con un 2% de suero bovino fetal, una mezcla de antibióticos y antifúngicos y un 1% de glutamina <sup>4</sup>.

El crecimiento se detecta por la aparición de focos de células agrandadas, refráctiles en la monocapa. Algunos aislados clínicos pueden formar sincitios con células gigantes multinucleadas en algunas líneas celulares. Todos estos efectos que produce el virus en las células y que sirven para detectar el crecimiento del virus se denominan de forma genérica efecto citopático (ECP).

El tiempo que transcurre hasta que se forma un ECP por el VHS es variable, ya que depende de la concentración del inóculo y del estado de la línea celular, pero puede aparecer tras 18-24 horas tras la inoculación. En el caso de bajos inóculos de virus, puede tardar entre 4 y 5 días <sup>21,173</sup>.

Una vez que ha crecido el virus en cultivo celular, hecho puesto de manifiesto por la aparición de un ECP, hay que confirmar que el responsable del ECP es el VHS y no se trata de otro virus o bien de efectos tóxicos

inespecíficos. Actualmente, desde la aparición de los anticuerpos monoclonales, esta tarea es sumamente fácil, ya que se limita a hacer una tinción de inmunofluorescencia o de inmunoperoxidasa a células procedentes de la línea celular infectada <sup>4,73,111</sup>. Un sistema más sofisticado de identificación es mediante hibridación ADN-ADN con un sistema *dot-blot*, con sondas de ADN sintético o clonado y específico para secuencias específicas de VHS-1 y VHS-2 <sup>56</sup>.

### **1.C.3. Pruebas serológicas.**

La utilidad de las pruebas serológicas en la infección por VHS es limitada y sólo se usa para determinar el estado inmunitario del paciente o bien para determinar si el paciente ha sido infectado por el virus en el pasado. Existen numerosos métodos que detectan con buena sensibilidad la inmunoglobulina G (IgG) en el suero de pacientes, independientemente de si han presentado de manera reciente signos de infección por VHS. La mayoría de laboratorios realizan estas pruebas de manera eficaz con equipos comerciales basados en técnicas de ELISA o de aglutinación con látex <sup>4,44,70</sup>. Sin embargo, debido a las reacciones cruzadas entre anticuerpos frente a VHS-1 y VHS-2, es imposible diferenciar entre infección pasada por VHS-1 o por VHS-2 <sup>5</sup>. Actualmente se han desarrollado métodos basados en la técnica Western-Blot que tratan de solventar este problema, ya que las glicoproteínas G (gG) de VHS-1 y de

VHS-2 presentan diferencias suficientes para ser detectadas con estas pruebas <sup>7,96</sup>.

Las infecciones recurrentes por VHS no siempre se acompañan de un incremento del título de anticuerpos, por lo que no se deben utilizar las pruebas serológicas para diagnosticar infecciones recurrentes por VHS. Sin embargo, en el caso de la primoinfección sí pueden tener utilidad, siempre que se demuestre una seroconversión con un suero anterior <sup>4</sup>.

La determinación de IgM no aumenta la especificidad del diagnóstico serológico en pacientes con signos clínicos de infección por VHS. La determinación de IgM anti VHS no puede utilizarse para diferenciar entre primoinfección e infección recurrente, ya que a menudo en las recurrencias hay producción de IgM anti-VHS <sup>4</sup>.

La determinación de IgG en líquido cefalorraquídeo como consecuencia de la producción intratecal de inmunoglobulinas puede utilizarse para documentar la presencia de encefalitis por VHS en algunos pacientes, pero en todo caso habrá que esperar un periodo de 2 a 4 semanas para que pueda aparecer un resultado positivo <sup>118</sup>.



#### 1.C.4. Técnicas moleculares.

Actualmente, el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se está viendo revolucionado con la aparición de múltiples técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico. Una técnica especialmente útil para el diagnóstico, no sólo de las infecciones por VHS, sino de otras muchas infecciones, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La característica fundamental de la PCR es su elevada sensibilidad, lo que hace que, para algunos cuadros clínicos asociados a infecciones por virus de la familia *Herpesviridae* sea la técnica considerada de referencia, aunque, en general debe usarse con precaución y tras agotar las posibilidades de las técnicas convencionales

124

La PCR, en el caso de las infecciones por VHS puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de infecciones herpéticas graves principalmente en pacientes inmunocomprometidos y en neonatos, ya que se aumenta mucho la sensibilidad frente a las técnicas diagnósticas tradicionales<sup>57</sup>. Sin embargo, para el diagnóstico de infecciones menos graves como las lesiones dérmicas producidas por VHS no se recomienda usar la PCR como método diagnóstico, ya que en este caso el cultivo y las técnicas de detección de antígeno ofrecen resultados razonablemente rápidos y son más fáciles de realizar. La única aplicación de la PCR para el diagnóstico de infección por VHS que está unánimemente aceptada es en el diagnóstico

de la encefalitis herpética, en este caso la PCR se muestra claramente más sensible que el cultivo debido a que la cantidad de partículas víricas en la muestra es demasiado pequeña para que pueda ser detectada por el cultivo tradicional <sup>124,152</sup>.

## **1.D. FARMACOS ANTIHERPETICOS: MECANISMO DE ACCION Y USOS TERAPEUTICOS**

Existen en la actualidad varios fármacos antivirales activos frente al VHS y otros muchos en diversas fases de investigación.

Entre los fármacos usados con actividad antiherpética se encuentran vidarabina, aciclovir, valaciclovir, famciclovir, penciclovir y foscarnet. Todos ellos, excepto foscarnet (ácido fosfonofórmico), son análogos de nucleósidos que interfieren en la síntesis del ADN. Todos pueden usarse por vía parenteral para tratar infecciones sistémicas por VHS o bien por vía tópica.

### **1.D.1. Vidarabina:**

La vidarabina (9- $\beta$ -D-arabinofuranosiladenina, Ara-A o arabinósido de adenosina) ha demostrado ser activa en la encefalitis herpética y en la infección neonatal por VHS <sup>80</sup>. En diversos estudios doble ciego con control de placebo de tratamiento de encefalitis por VHS, se demostró que una dosis intravenosa de vidarabina de 15 mg/kg/día durante 10 días podía reducir la mortalidad y la morbilidad de la infección <sup>80,166</sup>. También se mostró eficaz en las infecciones neonatales por VHS <sup>80,169</sup>. La vidarabina también es útil para tratar por vía tópica la queratitis herpética <sup>80</sup>.

El problema que presenta el manejo de la vidarabina son sus grandes efectos adversos, que son en su mayor parte efectos neurológicos: parestesias, ataxias o convulsiones. Normalmente estos efectos desaparecen al retirar el tratamiento. La existencia de problemas hepáticos y/o renales predispone a la aparición de estos efectos adversos<sup>80</sup>. Debido a estos efectos adversos y a que otros antiherpéticos son mucho menos tóxicos, la vidarabina prácticamente no se usa en España.

#### **1.D.2. Aciclovir:**

La aparición del aciclovir (9-(2-hidroxietoximetil)guanina) significó el mayor avance en la terapéutica antiherpética<sup>168</sup>. Hoy día es, con mucho, el antiherpético más usado.

La infección de las células por el VHS provoca la inducción de una timidinkinasa (TK) vírica que fosforila el aciclovir formando aciclovir monofosfato, que es posteriormente transformado en aciclovir trifosfato mediante las quinasas celulares. El aciclovir trifosfato es un potente inhibidor de la ADN polimerasa y presenta poca toxicidad celular, ya que requiere la presencia de una timidinkinasa vírica<sup>80</sup>.

El aciclovir se comercializa en España con 3 formas farmacéuticas: tópica, intravenosa y oral.

En el caso del herpes genital, las tres formas tienen utilidad en el tratamiento del herpes genital primario. La formulación oral se recomienda para la mayoría de los casos (200 mg cinco veces al día durante 10 días). El aciclovir tiene efecto en los brotes de herpes genital recurrente y parece que tiene eficacia a la hora de evitar futuras recurrencias, por lo que se recomienda su uso en el tratamiento del herpes genital recurrente en pacientes inmunocompetentes <sup>80</sup>. En pacientes susceptibles de padecer infecciones graves y frecuentes, el tratamiento e incluso una profilaxis con aciclovir sí estarían indicados. Respecto a la seguridad del tratamiento, en diversos estudios, se ha demostrado que el aciclovir es seguro y eficaz incluso tras tratamientos tan prolongados como de 1 año <sup>72</sup>.

Se puede seguir eliminando VHS, a pesar de que haya una mejoría clínica por el tratamiento con aciclovir <sup>80</sup>.

El uso de aciclovir en las infecciones orolabiales por VHS ha sido menos estudiado. En el caso de herpes labiales recurrentes, parece que sólo es efectivo el tratamiento si se instaura en la fase prodrómica de la infección, y no puede ser recomendado de manera general <sup>80,148</sup>.

En el caso de pacientes inmunocomprometidos, el aciclovir es útil como tratamiento y como método de supresión de lesiones por VHS mucocutáneo recurrente <sup>80,72,115</sup>. En el caso de episodios agudos, el

tratamiento con aciclovir reduce la eliminación de virus <sup>162</sup>, los síntomas locales (dolor, etc) y el tiempo de curación. El aciclovir también es útil para prevenir las recurrencias herpéticas en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo los transplantados, leucémicos con quimioterapia y pacientes con SIDA <sup>80,150</sup>.

El aciclovir parenteral se recomienda en infecciones diseminadas o del sistema nervioso central. En diversos estudios se ha demostrado superior a la vidarabina, tanto en reducir la mortalidad como en la menor aparición de efectos adversos <sup>80,165</sup>.

Debido a la baja biodisponibilidad del aciclovir oral, se ha desarrollado un éster del aciclovir, denominado valaciclovir <sup>63,112,138</sup>, que mejora sustancialmente la biodisponibilidad oral del fármaco. Existen en estudio diversas modificaciones en la forma farmacéutica del aciclovir para conseguir el mismo efecto y mejorar su biodisponibilidad y liberación.

El aciclovir tiene una toxicidad aguda pequeña. Raramente se ha descrito neurotoxicidad (desorientación, alucinaciones, ataxia y convulsiones) y disfunción renal reversible, especialmente tras una infusión rápida en bolo.

Un problema que va cobrando importancia y que es objeto de esta

tesis es la aparición de cepas de VHS resistentes a aciclovir, particularmente en tratamientos crónicos <sup>116</sup> y en pacientes inmunocomprometidos <sup>23,25,89,132</sup>. Los mecanismos por los que se pueden desarrollar resistencias a antivirales se discutirán más adelante, pero se puede adelantar que en el caso de resistencias a análogos de nucleósidos, el mecanismo más frecuente es por la aparición de una timidín quinasa con afinidad alterada (TK-). Las cepas resistentes a aciclovir están asociándose cada vez más con infección progresiva, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, y es posible que esta resistencia se transforme en un gran problema en los próximos años <sup>80</sup>. En estos casos el tratamiento de elección es el foscarnet.

#### **1.D.3. Penciclovir/Famciclovir:**

Recientemente ha aparecido en el mercado el famciclovir (deacetyl-deoxi-penciclovir), profármaco oral del penciclovir (9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-1-il)guanina), con indicación en el tratamiento del zóster; pero es un fármaco también activo frente a infecciones por VHS y con actividad *in vitro* frente al virus de la hepatitis B <sup>13,14,47,63,103,126,129,144,158</sup>.

El mecanismo de acción es similar al del aciclovir. Una vez absorbido, el famciclovir se transforma en penciclovir mediante oxidaciones y desacetilaciones sucesivas <sup>161</sup>. El penciclovir penetra en las células

infectadas, donde sufre una primera fosforilación por la timidín quinasa vírica, transformándose en penciclovir monofosfato, que es el sustrato de las quinasas celulares que lo transforman en penciclovir trifosfato. El penciclovir trifosfato es el compuesto verdaderamente activo y actúa como análogo de la guanina, incorporándose al ADN e impidiendo la replicación correcta del ADN vírico. Es en la fase de fosforilación donde el penciclovir parece mostrarse mejor que el aciclovir, ya que lo hace más rápido, además se absorbe mejor en la célula infectada <sup>160</sup>.

Tanto el famciclovir como el penciclovir no ofrecen ventajas frente al aciclovir en el tratamiento de las infecciones por VHS resistentes ya que éstos se muestran resistentes frente a cualquier análogo de nucleósido que requiera ser fosforilado por la timidín quinasa vírica.

#### **1.D.4. Foscarnet:**

El foscarnet (fosfonoformato trisódico) se sintetizó en 1924, pero no se demostró su actividad antiherpética hasta 1978 por Helgstrand <sup>67</sup>. En su forma ácida (ácido fosfonofórmico) es inestable, por lo que se usa su forma de sal trisódica.

Se trata del único antiherpético que no es un análogo de nucleósidos, sino que es un análogo del pirofosfato. Una vez ha penetrado en la célula infectada, no precisa fosforilarse, sino que se une a la ADN polimerasa



(ADNpol) vírica e impide que progrese la incorporación de nuevos nucleótidos. Su mecanismo de acción hace que sea el fármaco de elección para tratar infecciones por VHS resistentes a aciclovir<sup>90</sup>, ya que no requiere de la actuación de la TK, enzima que está alterada o ausente en los mutantes resistentes a aciclovir. Dado que la ADNpol es una enzima esencial para el virus, la selección de mutantes viables resistentes a foscarnet es difícil<sup>67</sup>.

El foscarnet se introdujo en el arsenal terapéutico para el tratamiento de las infecciones por CMV, pero puede ser muy útil en el tratamiento de infecciones por VVZ y VHS resistentes a aciclovir.

El mayor inconveniente del foscarnet es su falta de absorción oral, lo que obliga a administrarlo vía intravenosa, y la alta toxicidad, sobre todo a nivel renal, del metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Mg}^{2+}$ , así como la formación de úlceras genitales yatrogénicas. Esto hace que se use en casos muy restringidos. Actualmente se está estudiando la posible mejora de estos inconvenientes mediante manipulación galénica del foscarnet, como por ejemplo el uso de foscarnet liposomal, que permite administrar una dosis mayor, evitar en gran medida la toxicidad ya que se libera poco a poco, y aumentar su semivida en plasma<sup>51</sup>, así como formulaciones en crema para uso tópico<sup>147</sup>.

#### 1.D.5. Otros antiherpéticos:

Existen otros fármacos y sustancias naturales con actividad antiherpética en diferentes fases de investigación <sup>2,26,37,45,52,60,66,82,84,98,104,146,171</sup>. Todos aportan ventajas respecto al espectro de acción, a la farmacocinética o a la toxicidad. Sin embargo, al ser la mayoría análogos de nucleótidos que requieren ser fosforilados por la timidín quinasa vírica, no son activos frente a los VHS resistentes a aciclovir. Dentro de éstos, destacan por su avanzado estado de investigación los siguientes <sup>67</sup>:

- Sorivudina (bravavir, BVaraU): sin actividad frente a VHS-1 pero activo frente a VHS-2 y VVZ.
- Brivudina: con actividad frente a VHS y VVZ.
- HPMPC, (S)-1-[3-hidroxi-2-(fosfonilmetoxi)propil]-citosina: es un análogo de nucleósidos que no requiere fosforilación, y es activo frente a CMV, VVZ y VHS (incluidos los resistentes a aciclovir) <sup>95,145</sup>; presenta el problema de que es excesivamente tóxico para su administración sistémica (parenteral u oral), y, además ya se han comenzado a describir resistencias basadas en mutaciones a nivel de la ADN polimerasa <sup>3</sup>.

## **1.E. MECANISMO DE RESISTENCIA DEL VHS A ANTIVIRALES**

Como se ha indicado anteriormente, la presencia de virus herpes simplex resistentes a fármacos antivirales es un problema que potencialmente puede traer grandes problemas de tratamiento en el futuro.

En 1989, en una editorial de la revista *The New England Journal of Medicine* se hacía ya hincapié sobre la importancia y las implicaciones que podían tener las infecciones causadas por herpesvirus resistentes a antivirales en pacientes con SIDA <sup>81</sup>. No obstante, la existencia de virus herpes simplex mutantes resistentes a antivirales era ya un hecho conocido, ya que su selección en cultivos celulares no era difícil <sup>42</sup>. Es más, ya se habían aislado cepas clínicas de VHS resistentes a aciclovir <sup>38,53,123</sup>. Estas infecciones por VHS resistentes a aciclovir no estaban relacionadas con infección progresiva en pacientes inmunocompetentes, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos sí que se asociaron a enfermedad progresiva <sup>24,55,61,102</sup>. La importancia de estos aislados ha ido en aumento según ha aumentado la población inmunocomprometida, especialmente los pacientes con SIDA <sup>61</sup>.

Como se ha visto anteriormente, los fármacos antivirales actualmente disponibles se pueden dividir en dos categorías: la primera categoría estaría compuesta por análogos de nucleósidos (aciclovir, penciclovir, vidarabina),

que requieren ser fosforilados en primer lugar por la timidín quinasa vírica y posteriormente por las quinasas celulares hasta su respectivo derivado trifosfato, y entonces actúan como inhibidores de la síntesis del ADN al actuar sobre la ADNpol. La segunda categoría de antivirales estaría compuesta por inhibidores directos de la ADNpol y su único representante hasta el momento es el foscarnet. Según esto, caben dos mecanismos de resistencia que afectan de manera diferente a los fármacos incluidos en los dos grupos. Así, alteraciones en la TK vírica suponen que el VHS se hace resistente a los antivirales de la primera categoría, y una alteración en la ADNpol supone en principio resistencia a las dos categorías de antivirales.

#### **1.E.1. Resistencia debida a timidín quinasa (TK) alterada o deficiente:**

La resistencia por fallos en la fosforilación del agente antiviral se debe en la mayoría de las veces a mutantes que expresan niveles pequeños de TK o bien expresan una TK no funcional (TK-) por mutaciones puntuales <sup>61,68,122</sup>. También se han descrito mutantes en los que la enzima es capaz de fosforilar a la timidina, su sustrato fisiológico, pero no al aciclovir <sup>22,42,53</sup>. La existencia de estos mutantes con la TK alterada sugiere que si hubiera un conocimiento mayor de la estructura del dominio enzimático de la TK se podrían diseñar agentes antivirales más efectivos. Sin embargo, se han hecho pocos estudios genéticos para estudiar la estructura del dominio activo de la TK de VHS. En 1986, Darby y cols. <sup>41</sup> postularon un modelo

basándose en las características fenotípicas de estos mutantes. Según este modelo, actúan tres regiones de manera compenetrada. Estas regiones son un bolsillo de unión de nucleótidos, un lugar de unión de ATP y un lugar de unión de la timidina. A medida que se vayan estudiando más estos mutantes se entenderá mejor la estructura del centro con actividad catalítica de la enzima, que hoy día no está del todo esclarecida.

En los pacientes inmunocompetentes, la presencia de aislados de VHS resistentes a aciclovir no se ha relacionado con enfermedad progresiva, sin embargo, en los pacientes inmunocomprometidos sí que se ha relacionado <sup>24,25,54,61</sup>.

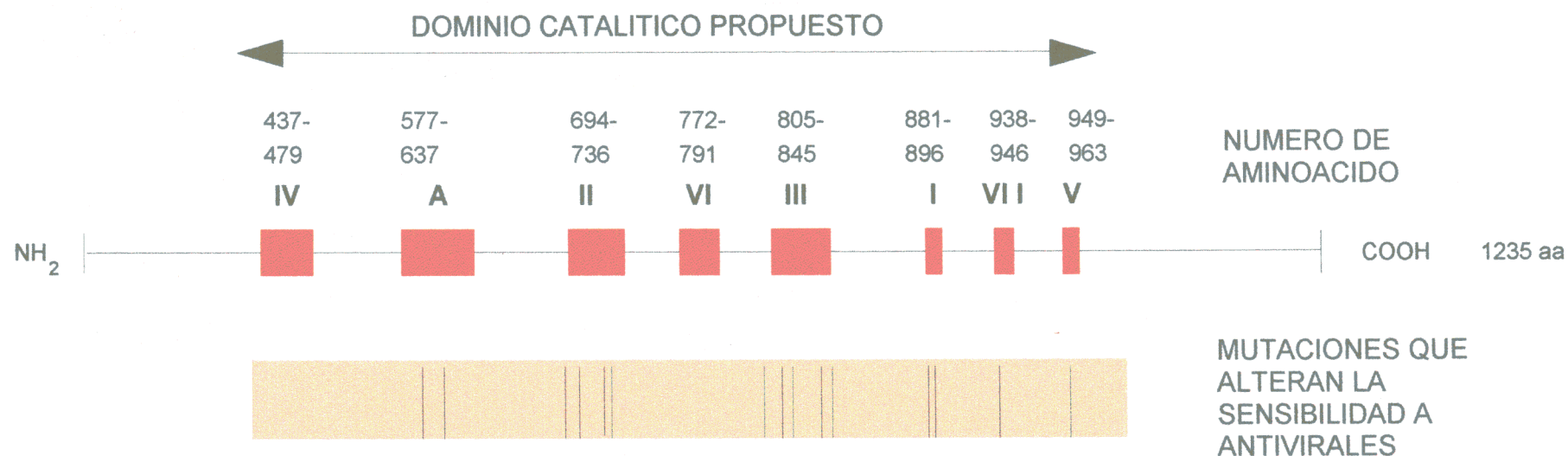
Debido a que el problema de las infecciones por VHS resistentes a aciclovir sigue aumentando, esencialmente en los pacientes infectados por el VIH, y a que la mayoría de estos aislados son deficientes en TK, se ha prestado mayor atención al establecimiento de tratamientos alternativos al aciclovir. Así, los aislados resistentes a aciclovir por este mecanismo, lo son también a penciclovir y a ganciclovir (fármaco cuya principal indicación terapéutica es frente a las infecciones por citomegalovirus), pero se muestran sensibles *in vitro* frente a vidarabina y a foscarnet. Sin embargo, sólo se muestra eficaz *in vivo* el foscarnet. Esto se justifica por el mecanismo de acción del foscarnet, que inhibe directamente la ADNpol, sin tener que sufrir ninguna fosforilación previa por la TK vírica <sup>61,131</sup>.

### 1.E.2. Resistencia debida a ADN polimerasa alterada:

Hasta 1989 sólo se obtenían cepas de mutantes de VHS resistentes a antivirales por este mecanismo en el laboratorio, y se utilizaban para estudios de estructura-actividad de los dominios del gen de la polimerasa <sup>62</sup>. El verdadero interés por estos mutantes surgió cuando se comenzaron a obtener a partir de aislados clínicos <sup>27,83,130,137</sup>. Las mutaciones en la ADNpol afectan a la actividad tanto de análogos de nucleótidos como al foscarnet, ya que es ésta enzima la diana última de todos los antiherpéticos utilizados hoy día. Hasta ahora, los aislados de VHS con ADNpol mutada son poco frecuentes, pero es esperable un aumento de los mismos por selección <sup>61</sup>.

Las ADN polimerasas de VHS-1 y VHS-2 son enzimas multifuncionales de 1235 y 1240 aminoácidos respectivamente, con funciones principalmente de exonucleasa y de desoxirribonucleótido polimerizante. La ADNpol de VHS pertenece a una gran familia de alfa-polimerasas y tiene 6 regiones con secuencias relativamente conservadas que supuestamente son las responsables de la función polimerizadora. Las regiones se numeran de I a VII según el grado de conservación, siendo la I la región más bacteriófagos hasta en mamíferos, indicando que estas regiones están implicadas en las funciones catalíticas más esenciales. En un mapa lineal de la ADNpol, como se refleja en la figura 1, éstas regiones

**FIGURA 1: CONFIGURACION LINEAL N-TERMINAL A C-TERMINAL  
DE LA ADNpol DEL VHS 1<sup>61</sup>**



**LAS REGIONES CONSERVADAS SE REPRESENTAN POR LAS CAJAS (I-III Y A). LOS  
MUTANTES DE AISLADOS CLINICOS Y DE LABORATORIO SE INDICAN MEDIANTE LINEAS  
VERTICALES.**

están ordenadas desde el extremo N terminal como IV, II, VI, III, I, VII y V

61

Observando la frecuencia de mutaciones en aislados resistentes con ADNpol mutada y viendo su posición, se ha podido llegar a deducir regiones funcionales de la enzima (ver figura 1). Así, las mutaciones que implican resistencia a análogos de nucleósidos como aciclovir, penciclovir o ganciclovir, deben afectar a zonas de la enzima que son importantes para el reconocimiento del nucleósido trifosfato, mientras que mutaciones que impliquen sólo resistencia a análogos del pirofosfato, como el foscarnet, implicarían a zonas importantes para el reconocimiento del pirofosfato. Estas mutaciones que afectan a la sensibilidad tanto a análogos de nucleósidos como a foscarnet se han localizado principalmente en las regiones I, II y III así como en la región denominada A; ésta es una región relativamente no conservada localizada entre las regiones IV y II<sup>83,100,101</sup>. El conocimiento profundo de estas alteraciones que provocan la aparición de resistencias es importante para poder estudiar nuevos inhibidores de la ADNpol activos frente a mutantes resistentes a aciclovir.



## **1.F. METODOS PARA LA DETERMINACION *IN VITRO* DE LA SENSIBILIDAD DE VHS A ANTIVIRALES**

Debido a que las cepas de VHS mutantes resistentes a fármacos antivirales van cobrando cada vez más importancia clínica tanto por su número como su asociación cada vez más clara con enfermedades progresivas<sup>38,53,55,61,81,102,130,155</sup>, la determinación de la sensibilidad *in vitro* de aislados clínicos de VHS puede estar indicada en determinadas situaciones. El empeoramiento de las lesiones producidas por una infección por VHS, en tratamiento con aciclovir, puede hacer pensar que se trata de una cepa resistente a este antiviral. Hoy día existe tratamiento alternativo (foscarnet)<sup>102</sup>, por lo que la realización de técnicas destinadas a conocer la sensibilidad *in vitro* de VHS estaría justificada ya que pueden influir en un cambio en el manejo terapéutico del paciente con infección por VHS. También puede ocurrir lo contrario, y es que se trate de una infección por VHS que recurra muy a menudo, pero que se demuestre que es sensible a aciclovir, entonces, en este caso, el cambio de tratamiento a foscarnet no estaría justificado, ya que el aciclovir es activo frente a estos aislados y además presenta una toxicidad mucho menor que el foscarnet<sup>9</sup>.

Lo primero que hay que hacer para estudiar los principales métodos existentes para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a antivirales es definir lo que es resistencia a antivirales. Esta es un descenso en la

sensibilidad a un agente antiviral que puede determinarse claramente mediante pruebas *in vitro* y que puede ser confirmado mediante análisis genético del virus o mediante estudios bioquímicos de las enzimas alteradas. La resistencia *in vitro* debe ser distinguida de la resistencia clínica, en la que la infección no cura con el tratamiento adecuado. Los fracasos terapéuticos pueden ser debidos o no a la presencia de cepas resistentes a antivirales *in vitro*, ya que dependen de otros factores como son el estado inmunitario del paciente y la farmacocinética del fármaco. Estos factores, y probablemente otros, hacen que a pesar de que una cepa de VHS se muestre como sensible *in vitro* a aciclovir u otro antiviral, aparezca una mala respuesta al tratamiento <sup>155</sup>. Sin embargo, la resistencia *in vitro* se ha correlacionado bien con la resistencia clínica; por ejemplo, existen estudios que demuestran que en pacientes infectados por el VIH con infecciones por VHS refractarias a aciclovir, los aislados de VHS de sus lesiones eran frecuentemente deficientes en TK y mostraban una concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de aciclovir mayor de 2 µg/ml <sup>54,135</sup>.

Al contrario que en los métodos para determinar la sensibilidad de bacterias a antibióticos, en el caso de la determinación de sensibilidad a antivirales no existe ningún método estándar establecido. Si se estudia el mismo aislado de virus, en este caso de VHS, se pueden obtener resultados muy diferentes dependiendo de la línea celular utilizada, el título del inóculo utilizado (así, un inóculo muy alto puede hacer que un aislado sensible

aparezca como resistente y un inóculo demasiado pequeño puede hacer que un aislado resistente aparezca sensible) y del método utilizado <sup>43,50</sup>. Por ejemplo el método de absorción de colorante (*dye uptake* -DU-) para determinar la sensibilidad *in vitro* de VHS brinda  $CI_{50}$  mayores que el ensayo de reducción de placas (ERP) <sup>155</sup>. La  $CI_{50}$  se define como la concentración de antiviral capaz de inhibir al 50% la cantidad de virus presente en el inóculo. Son sinónimos de la  $CI_{50}$ , la dosis inhibitoria 50 ( $DI_{50}$ ) y la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ). Los resultados de la sensibilidad se expresan normalmente como  $CI_{50}$ , debido a que el punto del 50% presenta una mayor precisión matemática que los puntos 90 y 99% ( $CI_{90}$  y  $CI_{99}$ ). Las  $CI_{90}$  parece que se correlacionan mejor con la clínica, pero son menos precisas y reproducibles que las  $CI_{50}$ , por lo que generalmente se recomienda el uso de la  $CI_{50}$  <sup>155</sup>.

Otra variable crítica es la heterogeneidad dentro de un "aislado" de virus. Un aislado realmente representa una mezcla de virus con fenotipos sensibles y resistentes a antivirales <sup>79,123</sup>. Una población de virus que nunca haya estado en contacto con antivirales es predominantemente sensible a antivirales, estando presentes en bajo número los virus resistentes. Esto hace que en pacientes inmunocomprometidos, que están sometidos a una gran presión antiviral selectiva continua, puedan seleccionarse virus resistentes, y su presencia se suele correlacionar con infección vírica progresiva <sup>10,23,54,133,134,135</sup>.

Otra variable importante es la localización genética de la mutación que confiere resistencia a antivirales. Por ejemplo, generalmente, las mutaciones en la ADNpol de VHS confieren menores aumentos de  $CI_{50}$  que las mutaciones en la TK, de tal forma que las primeras pueden pasar desapercibidas en una población de virus mixta <sup>155</sup>.

Todos estos problemas se pueden solventar en mayor o menor grado estandarizando todos los factores. Además, ya que actualmente existen tratamientos alternativos para las infecciones por VHS resistentes a aciclovir (foscarnet) y probablemente se desarrollen nuevos tratamientos, va cobrando cada vez más importancia la determinación de sensibilidad de VHS (y de otros virus), así como la optimización de métodos rápidos y sencillos para la detección de virus resistentes a antivirales <sup>155</sup>.

Actualmente existen varios métodos desarrollados para la determinación de sensibilidad a antivirales. Dos de ellos son los recomendados por la Sociedad Americana de Microbiología (*American Society for Microbiology* -ASM-) para el VHS <sup>154</sup>: el ensayo de reducción de placas (ERP) y el método de hibridación de ADN Hibriwix®. Además, existen otros métodos desarrollados para el VHS, como el de absorción de colorante (DU), y varios métodos rápidos basados en el ERP <sup>34,35</sup>. El ensayo de reducción de placas y otro método rápido basado en el ERP (llamado en este trabajo método de despistaje) son los métodos utilizados en este

estudio para determinar la sensibilidad de los aislados clínicos de VHS, por lo que se describirán detalladamente en el capítulo de material y métodos. Existen, además otros ensayos basados en el estudio de la capacidad de fosforilación de productos como el aciclovir por parte de cepas de VHS aisladas de un cultivo tradicional, por métodos radiactivos, en un medio celular carente de TK (células 143 B); también se puede estudiar la cinética de la TK en sobrenadantes de aislados virales crecidos en monocapas de células 143 B con un sustrato radiactivo a fosforilar. En estos dos casos el inconveniente principal es la utilización de material radiactivo, lo que limita en cierta medida su uso <sup>124</sup>.

A continuación se describen los principios de los métodos más importantes:

#### **1.F.1. Ensayo de reducción de placas (ERP):**

El ERP es considerado clásicamente el estándar para determinación de sensibilidad a antivirales, y frente al que se compara cualquier nuevo método <sup>155</sup>. El principio del ERP es la inhibición de la formación de placas virales en un cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de fármaco antiviral. El ERP es un método tedioso que consume gran cantidad de reactivos, en comparación con otros métodos. Antes de realizar el ERP hay que hacer una titulación del inóculo de VHS para posteriormente

ajustarlo a 200-400 unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro. Este método sirve para determinar la sensibilidad de VHS, CMV y VVZ frente a antivirales <sup>154,155</sup>

Existen varios métodos rápidos basados en el ERP, uno de ellos es el utilizado en este trabajo. Este método de despistaje consiste en enfrentar los inóculos desconocidos de virus a las concentraciones de corte de los antivirales estudiados y realizar una titulación con y sin antiviral. Si se observa que el VHS se inhibe con antiviral, se trata de un aislado sensible, mientras que si no se inhibe (el título es igual sin y con antiviral), se trata de un aislado resistente <sup>106,124</sup>.

Tanto este método de *screening* como el ERP se describen con detalle en el capítulo de material y métodos.

#### **1.F.2. Método de absorción de colorante (*dye uptake*-DU-):**

El método de DU se ha utilizado mucho para determinar la sensibilidad de VHS <sup>78,105</sup>. Este método se basa en la absorción preferente de un colorante vital (rojo neutro) por las células viables en comparación con las células no viables. La capacidad lítica del VHS se mide por la diferente cantidad de colorante fijado en las células infectadas y las no infectadas. El colorante fijado por las células se elimina con metanol y se

mide por colorimetría. La concentración de antiviral capaz de inhibir la capacidad lítica del inóculo de VHS al 50% es la  $CI_{50}$  <sup>155</sup>.

El método de DU proporciona una  $CI_{50}$  entre 3 y 5 veces mayores que el ERP. Estas diferencias se pueden deber al mayor inóculo utilizado en el método de DU (500 UFP/ml). En el método de DU, se considera una cepa de VHS resistente a aciclovir si la  $CI_{50}$  es mayor de 3  $\mu\text{g/ml}$ . La principal ventaja de este método es que se puede semiautomatizar, pero presenta serios inconvenientes, como los problemas por sobrecrecimiento de las células y precipitación del colorante, así como que el material para su semiautomatización es relativamente caro <sup>78</sup>.

### **1.F.3. Método de hibridación de ADN Hybriwix®:**

Existen equipos comerciales de hibridación ADN-ADN (Hybriwix® Probe Systems) capaces de cuantificar los ADN de VHS, CMV y VVZ en presencia de diferentes concentraciones de antivirales. Cada equipo contiene placas de cultivo celular, medio de mantenimiento, reactivo de lisis, filtros de nylon cargados negativamente (*wicks*), sonda marcada con <sup>125</sup>I, solución de hibridación, reactivo de lavado y filtros control negativos y positivos. La infección de la monocapa celular e incubación se realiza de la misma manera que en los demás métodos. Después del tiempo adecuado de incubación, se lisan las células y se desnaturaliza el ADN por la adición

del reactivo de lisis. Se colocan los filtros de nylon verticalmente en cada pocillo y los lisados se transfieren por capilaridad a los filtros. Una vez secos, se colocan los filtros en un vial con sondas marcadas con  $^{125}\text{I}$ . Después de una reacción de hibridación de 2 horas, los filtros se lavan y se dejan secar. La radiactividad se cuantifica en un contador gamma. La concentración que causa una reducción del 50% en las lecturas del contador gamma comparadas con la lectura de los controles de virus sin antiviral es la  $\text{CI}_{50}$ . El tiempo total del proceso desde la hibridación es de aproximadamente 4 horas. Este método se ha demostrado efectivo para detectar VHS y VVZ resistentes a aciclovir <sup>54,133,135,156</sup>, así como para detectar CMV resistentes a ganciclovir <sup>40,149</sup>.

En el desarrollo de métodos de determinación de sensibilidad a antivirales clínicamente relevantes queda mucho que hacer. En primer lugar hay que estandarizar los métodos existentes y llegar a un consenso respecto a la línea celular a utilizar, el inóculo necesario, los criterios de determinación de puntos de corte, así como de las cepas control a utilizar. Además, mientras las cepas de virus resistentes (no sólo VHS) sigan apareciendo cada vez con mayor frecuencia, se hará cada vez más necesaria la determinación de sensibilidad *in vitro* a antivirales, así como el estudio *in vitro* de combinaciones de antivirales para determinar sinergismos o antagonismos <sup>155</sup>.



## **1.G. ALGUNAS CARENCIAS DE LA LITERATURA CIENTIFICA SOBRE VHS**

A pesar de que las infecciones por VHS se conocen desde hace siglos y de que son infecciones muy frecuentes, tras realizar diversas búsquedas bibliográficas electrónicas, no hemos encontrado ningún estudio nacional ni extranjero que ponga de manifiesto la carga de trabajo que soporta un laboratorio de microbiología de un hospital general con el fin de diagnosticar las infecciones por VHS. De igual manera, no hemos encontrado información sobre la evolución de los aislados de VHS en función del tiempo y de los ingresos hospitalarios, de manera que actualmente se desconoce si estas infecciones han aumentado en número o si, por el contrario, han disminuido o se mantienen estables.

Respecto a los estudios de sensibilidad de los VHS a antivirales, a pesar de la gran cantidad de comunicaciones científicas sobre VHS resistentes a antivirales que hacen pensar que no se trata ya de problemas puntuales y ajenos a la realidad hospitalaria, no conocemos ningún estudio de sensibilidad global en el que se incluyan, de manera sistemática todos los aislados de VHS sin hacer ninguna selección previa respecto a los grupos de pacientes. Esto es debido, quizás, a que los métodos de estudio de sensibilidad a antivirales son muy laboriosos, poco reproducibles y poco rentables en función esfuerzo/tiempo. Esto es lo que ha motivado uno de los objetivos de este trabajo, que es poner a punto un método rápido y

sencillo de detección de VHS resistentes a antivirales que sea factible para laboratorios hospitalarios, de manera que se pueda realizar como una técnica más en el laboratorio de virología clínica de un hospital general.

Una vez conocida la tasa de VHS resistentes, la pregunta lógica es ¿se comportan estos VHS igual que los sensibles o no?. Buscando respuestas, se ve que existe una falta de información precisa y clara, especialmente en el caso de los hospitales españoles, sobre cuál es la situación de las infecciones por VHS resistentes a antivirales, si se comportan igual que las sensibles, si existe algún factor de riesgo que pueda hacer pensar en una infección de este tipo, si evolucionan de igual manera, etc.

Con el fin de cubrir estas carencias nos hemos marcado los siguientes objetivos:

## **2. OBJETIVOS**

1.- Poner en perspectiva la carga de trabajo necesaria para el aislamiento de VHS en el contexto del trabajo global de un servicio de microbiología de un hospital general.

2.- Determinar la incidencia y evolución en el tiempo de la infección por VHS en referencia al número de ingresos de un hospital general y al número de muestras del servicio de microbiología.

3.- Desarrollar y evaluar un procedimiento simplificado para la determinación de sensibilidad de aislados de VHS frente a antivirales de uso común, que pueda permitir su uso rutinario.

4.- Estudio de las resistencias a antivirales de los aislados de VHS de un hospital general español.

5.- Estudio de las características clínicas de los pacientes con infecciones por VHS resistentes a antivirales y establecimiento de posibles factores de riesgo que puedan predecir la aparición de resistencias en VHS.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### **3.1. CARACTERÍSTICAS DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO**

#### **"GREGORIO MARAÑÓN"**

El estudio que se presenta ha sido realizado en el Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" (HGUGM), centro sanitario docente y de referencia adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y que depende administrativamente de la Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Comunidad Autónoma de Madrid. Está dotado de 2.000 camas y presta cobertura asistencial aproximadamente a 650.000 personas. Esta cobertura comprende pacientes del área 1 de la Seguridad Social, enfermos sin recursos económicos (antigua Beneficencia Pública) y pacientes procedentes del Hospital General Penitenciario.

El HGUGM es un hospital general que cuenta con servicios generales y unidades de alta especialización. Presta asistencia sanitaria de primer nivel a través de su servicio de Urgencias, actúa como centro de referencia de segundo nivel a través de las consultas ambulatorias divididas por especialidades y es centro de referencia de tercer nivel a través de los servicios médicos y quirúrgicos.

Los servicios de Ginecología y Obstetricia, Pediatría y Puericultura y algunos servicios de apoyo de éstos están separados físicamente del conjunto hospitalario y dotados de autonomía funcional.

El Laboratorio de Microbiología es único para el conjunto y procesa anualmente un número de muestras cercano a 200.000. Está integrado por 14 áreas de trabajo, todas ellas informatizadas y dotadas adecuadamente desde el punto de vista tecnológico. A su vez, el Servicio asume la dirección de la Unidad de Enfermedades Infecciosas que consta de varias consultas externas, una unidad de hospitalización y un hospital de día, en todas ellas se atiende a pacientes con afecciones de infectología general, pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y enfermedades de transmisión sexual (ETS). Los componentes del Servicio realizan, además, una labor de asesoramiento clínico-terapéutico mediante consultas interdepartamentales.

### **3.2. MECANICA DE TRABAJO**

Se estudió la sensibilidad *in vitro* de todas las cepas de VHS aisladas en el Laboratorio de Virus del Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" desde que comenzó la labor del Laboratorio de Virus (septiembre de 1991) hasta diciembre de 1995. Han sido excluidas del estudio las muestras de un mismo origen pertenecientes a un solo paciente aisladas en un intervalo inferior a 8 días, con el propósito de obtener una mayor representatividad en los resultados.

Los datos del estudio de la carga de trabajo se han obtenido de la estadística anual del Servicio de Microbiología del HGUGM.

El estudio microbiológico incluye el aislamiento de las cepas de virus herpes simplex, realizado de forma rutinaria por el laboratorio de virus, tipado de los VHS que no lo fueron en el momento de su aislamiento, y la determinación de sensibilidad a antivirales mediante dos técnicas diferentes, con el fin de comprobar la correlación existente entre ellas. Estas técnicas han sido el ensayo de reducción de placas, método tradicionalmente considerado estándar y con el que se debe comparar cualquier otro <sup>155</sup>; y un método de detección rápida de resistencias de VHS a antivirales basado en el anterior. En el caso de aislados resistentes únicamente a penciclovir, se repitió la determinación de la sensibilidad utilizando células MRC-5 para ver si verdaderamente esos resultados estaban influenciados por el tipo de células <sup>43</sup>. En todos los casos se utilizaron como cepas control una cepa sensible, otra con una mutación a nivel de la TK (resistente a aciclovir) y otra con una mutación a nivel de la ADNpol (resistente a aciclovir y foscarnet), todas ellas cedidas por el Dr. Antonio Tenorio, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. El ensayo de reducción de placas se ha elegido por ser el método de referencia, mientras que el método rápido escogido es el utilizado en el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III. Los protocolos utilizados para



cada método se exponen detalladamente más adelante.

Los fármacos antivirales estudiados fueron los siguientes: aciclovir (Glaxo-Wellcome, Madrid), penciclovir (SmithKline Beecham, Madrid) y foscarnet o ácido fosfonofórmico (Sigma, Madrid).

Para la comparación de métodos, se estudiaron 84 cepas por ambos métodos (ensayo de reducción de placas y método de detección rápida de resistencias). Una vez comprobada la buena correlación entre ambos métodos, se continuó estudiando la sensibilidad de las cepas con el método de detección rápida de resistencias a antivirales. Todas las cepas resistentes a algún antiviral fueron examinadas por los dos métodos.

Todos los datos quedaron archivados en la base de datos informática *Microsoft Access®* del Laboratorio de Virología.

Para realizar ambas técnicas se utilizaron células Vero (células de riñón de mono verde africano) o en su caso células MRC-5 (células de pulmón de feto humano) mantenidas en frascos para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Dinamarca), las cuales se sembraban tres o cuatro días antes de su uso en placas de 96 pocillos de fondo plano, estériles y con tapa (Greiner, Frickenhausen, Alemania), al cabo de esos tres o cuatro días de incubación estaban ya listas para su uso. El medio de crecimiento y de

mantenimiento fue el medio mínimo esencial con sales de Earle -EMEM- (Biowhitaker, Verviers, Bélgica) al que se añadía una mezcla antibiótica (Biowhitaker, Verviers, Bélgica) de penicilina (10.000 U/ml), estreptomicina (10.000  $\mu$ g/ml) y anfotericina B (25  $\mu$ g/ml) al 1% con el fin de evitar contaminaciones bacterianas y fúngicas. También se añadía, en el momento de su uso, glutamina al 1% (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) y suero bobino fetal (SBF) (Harlan Sera-Lab, Crawley Down, Reino Unido), este último al 10% en el caso del medio de crecimiento de células y al 2% en el caso del medio de mantenimiento.

El resto de material utilizado para la realización de este estudio es el siguiente:

- PBS, pH 7,2 (BioMérieux España, Madrid).
- Solución acuosa de Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Solución de tripsina al 2,5% estéril (BioMérieux España, Madrid).
- Solución de EDTA al 1/5000 estéril (BioMérieux España, Madrid).
- Inmunoglobulina humana polivalente (Flebogamma i.v. líquida pasteurizada 2,5 g, Instituto Grifols, Barcelona)
- HSV 1/HSV 2 direct specimen identification/Typing test* (Syva, California, EEUU)
- Metanol absoluto, grado R (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metanol al 50% en agua bidestilada estéril.

- Agua bidestilada estéril (B.Braun Medical, Barcelona).
- Pipetas estériles de diversas medidas.
- Pipetas pasteur estériles.
- Tubos estériles de 10 ml.
- Agitador tipo Vórtex.
- Congelador de -70°C.
- Congelador de nitrógeno líquido.
- Campana de seguridad.
- Microscopio de luz invertida.
- Microscopio de fluorescencia.
- Estufa de 35-37°C con 5-8% de CO<sub>2</sub>.
- Baño de 37°C.
- Pipeta multicanal de 10-200 µl.
- Puntas de pipeta estériles.

### **3.3. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Previamente a la determinación de la sensibilidad hubo que preparar las muestras. Para ello se descongelaban los inóculos de VHS del archivo del Laboratorio de Virología y se sembraban en monocapas de células Vero frescas en tubos estériles. Si el virus crecía (se obtuvo un rendimiento en la descongelación de VHS mayor del 80%), se esperaba a que el ECP abarcara al 75% ó más de la monocapa y se congelaba el sobrenadante en

cuatro tubos estériles para su uso posterior. Dos tubos se dejaban en el congelador de -70°C para la determinación de sensibilidad y los otros dos tubos se congelaban, tras 24 horas a -70°C, en nitrógeno líquido para su archivo definitivo.

### **3.4. TIPADO DE LOS AISLADOS DE VHS**

Se tiparon todos los aislados de VHS que no se habían tipado previamente, ya que no se realiza de forma rutinaria con todos los VHS que se aíslan en el Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del HGUGM. Para ello se utilizó un equipo comercial denominado *HSV 1/HSV 2 Direct Specimen Identification/Typing test* de la casa Syva, que se trata de una técnica de inmunofluorescencia directa en un solo paso.

El procedimiento realizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, fue el siguiente. Parte de las células infectadas por VHS se fijaron con acetona al 80% a 4°C durante 15 minutos, bien sobre portaobjetos de cristal o bien sobre el fondo de placas de 96 pocillos. Se fijaban dos muestras de cada aislado de virus, para hacer inmunofluorescencia frente a VHS 1 y frente a VHS 2. Tras esto, se eliminó la acetona sobrante y después de lavar con agua, se añadió el reactivo para detección de VHS 1 y de VHS 2, en paralelo. El reactivo consta de anticuerpos murinos monoclonales frente a VHS 1 o VHS 2, azul de Evans como contraste y un supresor de tinción inespecífica. Se mantuvieron durante 30 minutos a

37°C y en cámara húmeda en contacto con el reactivo. Tras este tiempo, se lavaron con PBS y se dejaron secar. Una vez secos, se observaron con un microscopio de fluorescencia. Como para cada aislado de virus existía una inmunofluorescencia para VHS 1 y otra para VHS 2 se aseguraba de que no eran reacciones inespecíficas, y de esta manera se consiguieron tipar todos los VHS. Estos datos quedaron archivados en la base de datos *Microsoft Access*® del Laboratorio de Virología.

### **3.5. TITULACION DEL INOCULO DE VIRUS**

Para realizar el ensayo de reducción de placas (ERP), se titulaba previamente el inóculo de virus, para ajustarlo posteriormente a 200-400 UFP/ml (unidades formadoras de placa por mililitro). Como muestra se utilizó el material previamente congelado. En algunos casos también se utilizó el sobrenadante de un cultivo de VHS reciente.

Para calcular el inóculo se realizó la siguiente técnica:

Se preparaban el número adecuado de placas de 96 pocillos con monocapas confluentes de células Vero, preferiblemente de menos de una semana.

Se descongelaba rápidamente la alícuota del virus archivada temporalmente en el congelador de -70°C y se preparaban diluciones seriadas

1:10 de los diferentes inóculos de virus a titular, usando como diluyente el medio EMEM suplementado con un 2% SBF, glutamina al 1% y mezcla antibiótica.

Se eliminaba el medio de las placas con las monocapas y se inoculaban los pocillos con cada dilución del inóculo viral.

Tras esto, se cubrían las placas con su tapa y se agitaban horizontalmente para homogeneizar los inóculos. Se incubaba 4-5 días en estufa a 37°C y con un 5-8% de CO<sub>2</sub>.

Tras esta incubación, se observaba la producción de ECP en cada dilución, usando un microscopio invertido y con el objetivo de 20 aumentos se contaban las placas. Una placa se define, según la ASM, como un área focal de ECP que puede, o no, rodear un área clara de lisis celular.

Se calculaba entonces el número de UFP por ml de inóculo. Por ejemplo, si el número de placas en dos pocillos inoculados con 200  $\mu$ l de una dilución de 10<sup>-3</sup> era 15, el inóculo sin diluir tenía 15x10<sup>3</sup> UFP/200  $\mu$ l, es decir, 75.000 UFP/ml.

### **3.6. ENSAYO DE REDUCCION DE PLACAS (ERP)**

A continuación se detalla el ERP utilizado para la realización de este estudio, de acuerdo con las recomendaciones de la ASM <sup>154</sup> y adaptadas para el uso de placas de 96 pocillos estériles y con tapa.

Como se ha indicado anteriormente, se trata del método tradicionalmente considerado como estándar, y frente al que se debe comparar cualquier otro método de determinación de sensibilidad de virus <sup>155</sup>. El principio del método consiste en la inhibición de la formación de placas virales o focos de efecto citopático (ECP) en presencia de un antiviral, debido a la inhibición del crecimiento del virus.

Los pasos a realizar con este método incluyen: (i) cuantificación del virus y dilución a una concentración determinada de UFP/ml; (ii) inoculación de las placas de 96 pocillos; (iii) adición sobre la monocapa del medio que contiene el agente antiviral; (iv) incubación; (v) observación de las monocapas para determinar el número de placas; y (vi) cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>).

Tras la cuantificación del inóculo con el método indicado anteriormente, se diluyó el inóculo hasta obtener 200-400 UFP/ml, utilizando como diluyente el medio de mantenimiento celular (EMEM + 2%

SBF + glutamina + mezcla antibiótica). Una vez ajustado el inóculo, se procedió a realizar el ERP propiamente dicho, según la siguiente técnica.

Ensayo de reducción en placas (ERP) propiamente dicho:

Se utilizaron monocapas de células Vero de menos de una semana en placas de 96 pocillos con tapa y estériles.

Como muestra se usaron las diluciones de VHS previamente ajustadas a una concentración de 200-400 UFP/ml.

Las diluciones de antivirales se realizaron a partir de una solución madre de cada antiviral estudiado de 1.000  $\mu\text{g/ml}$  en agua bidestilada estéril. El rango de concentraciones seriadas al 1:2 utilizado, fue de 0,12 a 8  $\mu\text{g/ml}$  para el aciclovir y el penciclovir (7 diluciones) y de 6,25 a 400 para el foscarnet (7 diluciones). Se utilizó como diluyente EMEM-2% SBF con un 1% de inmunoglobulina humana policlonal, que servía de fijador líquido. Con este rango se cubría la detección de resistencias así como la detección de  $\text{CI}_{50}$  indicadoras de sensibilidad alterada, ya que se considera resistente a aciclovir y penciclovir una cepa cuya  $\text{CI}_{50}$  es superior a 2  $\mu\text{g/ml}$ ; y resistente a foscarnet cuando su  $\text{CI}_{50}$  es superior a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

El procedimiento es el siguiente:

Se inocularon el número apropiado de pocillos con 25  $\mu\text{l}$  de la



suspensión del VHS a estudiar (200-400 UFP/ml). Tras esto, se agitaba horizontalmente para distribuir el inóculo y se incubaba 1-2 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Después de esta incubación que servía para permitir la adsorción de los virus a las células, se eliminaba el inóculo de los pocillos, tras lo cual se añadían 250 µl de cada dilución de antiviral con un 1% de inmunoglobulina humana policlonal (IH) excepto al último pocillo de cada columna, que servía de control de crecimiento, a éstos se les añadía 250 µl de medio de mantenimiento de cultivo celular con un 1% de IH. La IH tiene la función de fijar los focos de VHS. Se incubaba entonces durante 72 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Tras esta última incubación se eliminaba el medio de los pocillos, se cubrían las monocapas con PBS para lavarlas y se añadía sucesivamente metanol al 50% y metanol absoluto. Después de eliminar el metanol absoluto, se cubrieron las monocapas con Giemsa al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaba el colorante, se dejaban secar bien las placas de 96 pocillos al aire y se contaban el número de placas de ECP teñidas en cada pocillo observándolas en microscopio de luz invertida a 20x.

Los resultados del ERP se analizaron por regresión lineal para calcular la concentración de antiviral que producía el 50% de inhibición de la formación de placas (concentración inhibitoria 50 -CI<sub>50</sub>-) al compararla con el control sin antiviral. Se admitía un error estándar del 20%, según recomendaciones de la ASM <sup>154</sup>.

### **3.7. METODO DE DETECCION RAPIDA DE RESISTENCIAS A ANTIVIRALES** **EN VHS**

A todos los aislados de VHS se les realizó la determinación de sensibilidad por este método. Este método no aporta valores de  $CI_{50}$  al no tratarse de un método cuantitativo sino cualitativo, pero aporta información de igual importancia clínica, ya que indica si un aislado es sensible o resistente.

El procedimiento seguido es el proporcionado por el Doctor Antonio Tenorio, del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid). Este método había sido previamente valorado por el grupo del Dr. Tenorio y otros grupos para detección de VHS resistentes a aciclovir <sup>106</sup> en cepas de laboratorio.

Además tiene la ventaja de que, al ser prácticamente igual que la titulación de inóculos virales, si se guarda una alícuota, se puede conocer a la vez el título de ésta.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 en EMEM + 2% SBF de los VHS control y de los VHS a estudiar de la siguiente manera. Sobre placas

de 96 pocillos estériles conteniendo monocapas recientes de células Vero, se retiraba el medio de crecimiento de las células y se añadía, por columnas y para cada VHS:

- en la primera columna: a todos los pocillos excepto el de la primera fila (7 pocillos), 200  $\mu$ l de EMEM con un 2% de SBF, glutamina y mezcla antibiótica.
- en la segunda columna: igual que en la primera, sólo que el medio contenía 2  $\mu$ g/ml de aciclovir.
- en la tercera columna: igual que en la primera pero con 2  $\mu$ g/ml de penciclovir.
- en la cuarta columna: igual pero con 100  $\mu$ g/ml de foscarnet.

La primera fila de todas las columnas sirve de control de crecimiento ya que no se añade ningún antiviral en cualquiera de los casos. En ésta primera fila se añade el inóculo de VHS a estudiar y se hacen diluciones seriadas al 1:10 pasando 20  $\mu$ l del inóculo sucesivamente a los pocillos siguientes.

De esta manera se obtiene que para cada VHS hay 4 columnas con diluciones seriadas 1:10 del inóculo, la primera sólo con medio de mantenimiento, la segunda con 2  $\mu$ g/ml en todos los pocillos, la tercera con 2  $\mu$ g/ml de penciclovir y la cuarta con 100  $\mu$ g/ml de foscarnet.

Tras esto, se agitaba la placa de 96 pocillos para homogeneizar los inóculos y se incubaba a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Se observaba el efecto citopático producido a los 3 y a los 5 días.

La interpretación de resultados se realizó por comparación del título obtenido en la columna sin antiviral y el obtenido en las columnas de cada antiviral. Así si en la columna sin antiviral se obtenía un título mayor que en los pocillos con antiviral, la cepa se consideró sensible. Si, por el contrario, los títulos sin antiviral y con antiviral eran iguales, significaba que la cepa de VHS no se inhibía con antiviral y la cepa se consideró resistente.

### **3.8. COMPROBACION DE LA INFLUENCIA DE LAS CELULAS USADAS PARA DETECTAR LA RESISTENCIA A PENCICLOVIR**

Hubo un número de cepas cuyos resultados de sensibilidad, obtenidos por los dos métodos anteriormente descritos, fueron de sensibilidad a aciclovir y foscarnet y de resistencia a penciclovir únicamente. Este fenómeno, ya descrito anteriormente, se debe a la influencia de la línea celular, de forma que utilizando otra línea celular estos aislados resistentes *in vitro* a penciclovir en una línea celular, pueden mostrarse como sensibles en otra distinta. A todos los aislados resistentes únicamente a penciclovir y a un número igual de VHS sensibles se les realizó la sensibilidad por los dos mismos métodos pero utilizando como

línea celular, células MRC-5.

### **3.9. ESTUDIO DE LAS HISTORIAS CLINICAS**

Se estudiaron las historias clínicas de los pacientes a los que se les aisló algún VHS resistente con el fin de determinar posibles factores de riesgo para la selección de VHS resistentes a aciclovir (como se indicará más adelante, la mayoría eran pacientes infectados por el VIH). Como control se estudiaron las historias de un grupo de pacientes también infectados por el VIH y con aislados de VHS sensibles.

Los datos que se recogieron de todos ellos fueron los siguientes:

- Nombre y apellidos.
- Número de archivo del aislado de VHS.
- Fecha de aislamiento.
- Edad del paciente.
- Sexo.
- Factor de riesgo para la infección por el VIH.
- Patrón de sensibilidad a antivirales del aislado.
- Linfocitos CD4 por mm<sup>3</sup>.
- Si había recibido o no tratamiento previo con aciclovir u otro fármaco antiherpético.
- Si estaba en el momento del brote recibiendo tratamiento de

mantenimiento con algún fármaco con actividad antiherpética.

- Evolución de la infección.
- Si recidivaba con posterioridad o no.
- Otros datos de interés.

Respecto a la evolución de las lesiones, éstas se limitaron a cuatro posibilidades: curación, mejoría, cronificación y empeoramiento. Como curación se entendió la desaparición total de las lesiones tras el tratamiento. Mejoría, reducción de las lesiones y/o del dolor pero sin que desaparecieran totalmente. Como cronificación, se entendió la permanencia de las lesiones herpéticas y del dolor en el tiempo a pesar de la instauración del tratamiento. Y como empeoramiento se entendió el aumento de tamaño y ulceración progresivos de las lesiones herpéticas a pesar del tratamiento antiviral.

### **3.10. ARCHIVO DE DATOS**

Todos los datos han quedado archivados en la base de datos *Microsoft Access*® disponible en el ordenador del Laboratorio de Virus del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón".

Los datos que se han archivado son los siguientes:

Nombre y apellidos del paciente.

Número de registro del Servicio de Microbiología del HGUGM.

Número de archivo de la base de datos.

Servicio de procedencia.

Virus aislado.

Fecha del aislamiento.

Localización del aislado en el archivo de N<sub>2</sub> líquido.

Tiempo que ha tardado en crecer.

Enfermedad de base del paciente.

Sensibilidad a aciclovir, penciclovir y foscarnet por el método de detección rápida.

Sensibilidad a aciclovir, penciclovir y foscarnet por el método estándar.

También quedaron archivados en la base de datos los datos de la revisión de las historias clínicas de los pacientes con aislados resistentes.

## **4. RESULTADOS**



#### **4.1. DATOS GENERALES. CARGA DE TRABAJO.**

Para determinar la carga de trabajo del Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" durante el periodo de estudio, se determinaron el número de ingresos hospitalarios, el número de muestras en las que se solicitó estudio microbiológico, el número de muestras en las que se solicitó estudio virológico y el número de muestras que resultaron positivas para virus; y se expresaron en relación al número de ingresos hospitalarios, al número de determinaciones microbiológicas y al número de pruebas positivas, como queda expresado en la tabla V.

**TABLA V:** Datos generales 1991-1995.

	1991	1992	1993	1994	1995	TOTAL
Ingresos hospitalarios (IH)	45.792	45.565	48.582	48.275	47.937	236.151
Muestras para Microbiología (MM)	90.600	108.000	132.164	117.489	127.436	575.689
Muestras para Virología (MV)	158	956	2.343	2.894	2.538	8.889
Muestras positivas para virus (MPV)	36	199	483	488	409	1615
MPV/1000 IH	0,79	4,37	9,94	10,11	8,53	6,84
MPV/1000 MM	0,40	1,84	3,66	4,15	3,21	2,80
MPV/100 MV	22,79	20,82	20,61	16,86	16,12	18,17

## **4.2. DATOS GENERALES: VIRUS HERPES SIMPLEX**

Durante el periodo de estudio se identificaron en el Laboratorio de Virología 401 VHS procedentes de muestras clínicas de pacientes de los diversos servicios del Hospital General "Gregorio Marañón".

En la tabla VI quedan detallados estos aislados por años, por pacientes con o sin anticuerpos frente al VIH (VIH+/VIH-), y por serotipos. Así mismo se expresan las cifras del número de VHS por 1.000 ingresos hospitalarios, por 1.000 muestras enviadas a Microbiología, por 100 muestras para estudio de virus y por 100 muestras con resultado positivo para virus.

**TABLA VI:** Datos generales de VHS. 1991-1995.

	1991	1992	1993	1994	1995	TOTAL
<b>Muestras con VHS</b>	14	80	93	111	103	401
<b>VHS 1/VHS 2/ NT</b>	10/4/0	42/38/0	55/32/6	66/33/12	53/32/18	226/139/36
<b>Paciente VIH + /VIH-</b>	4/10	37/43	43/50	57/54	54/49	195/206
<b>VHS/1000IH</b>	0,31	1,76	1,91	2,30	2,15	1,70
<b>VHS/1000 MM</b>	0,15	0,74	0,70	0,95	0,81	0,70
<b>VHS/100 MV</b>	8,86	8,36	3,97	3,84	4,06	4,51
<b>VHS/ 100 MPV</b>	38,90	40,20	19,25	22,75	25,18	24,83

NT: no tipados

Respecto al origen de las muestras con VHS, se observa en la figura 2 que la mayoría de las muestras con origen especificado eran orofaríngeas (35,4%) y genitales-anales (28,4%). Entre las muestras menos frecuentes se encontraban, 7

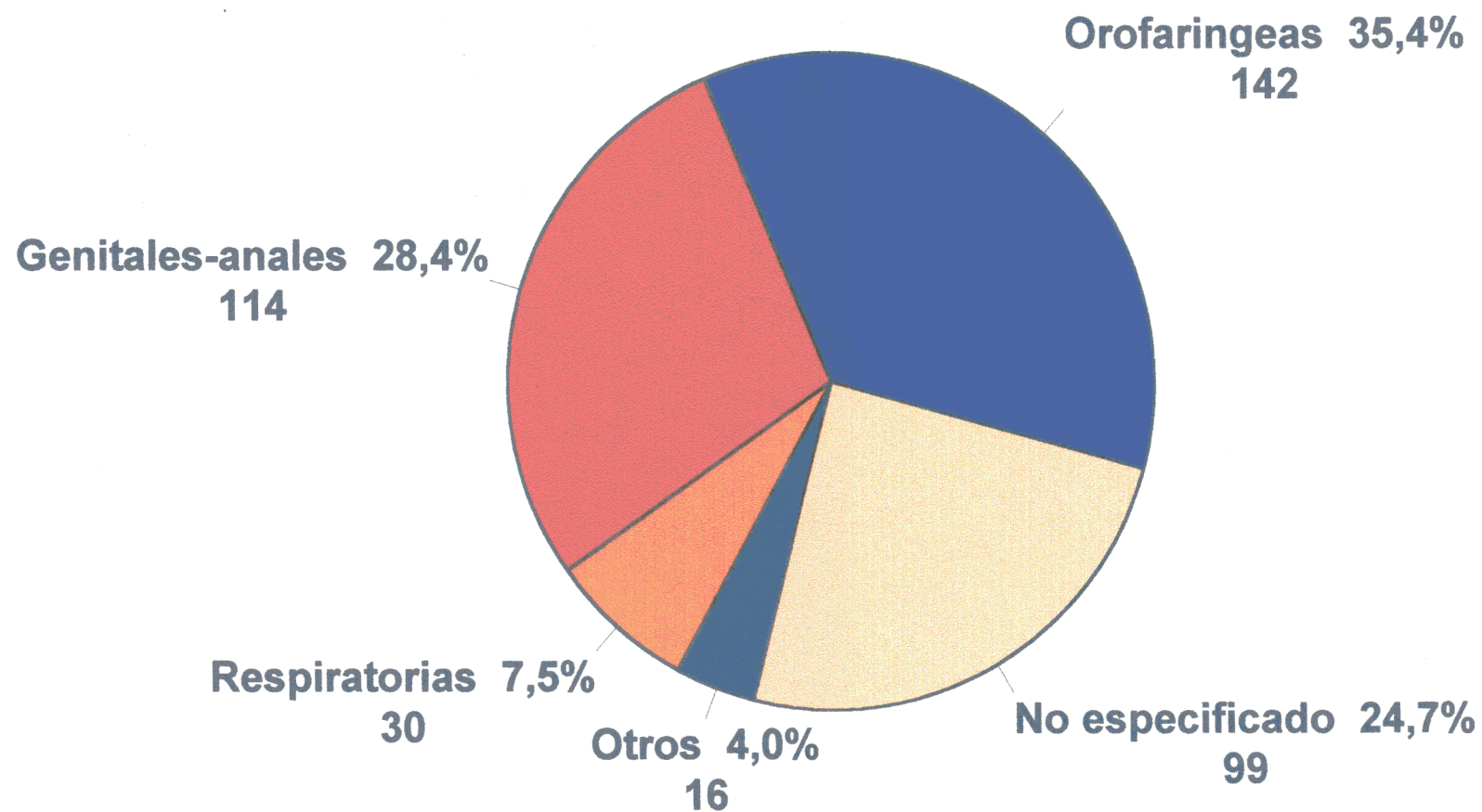
VHS procedentes de orinas, 30 de muestras respiratorias (6 catéteres telescopados y 24 lavados broncoalveolares o broncoaspirados), 1 de una lesión en la oreja, 5 de lesiones en dedos, 1 de una lesión en una pierna y 2 de biopsias esofágicas. Hubo 99 muestras en las que no se especificaba la localización de las lesiones herpéticas.

Se tiparon las cepas de VHS que en el momento de su detección no fueron tipadas, ya que se ha considerado importante este dato para este estudio. El método usado para tipar fue una tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales anti-VHS1 y anti-VHS2, técnica detallada en Material y Métodos.

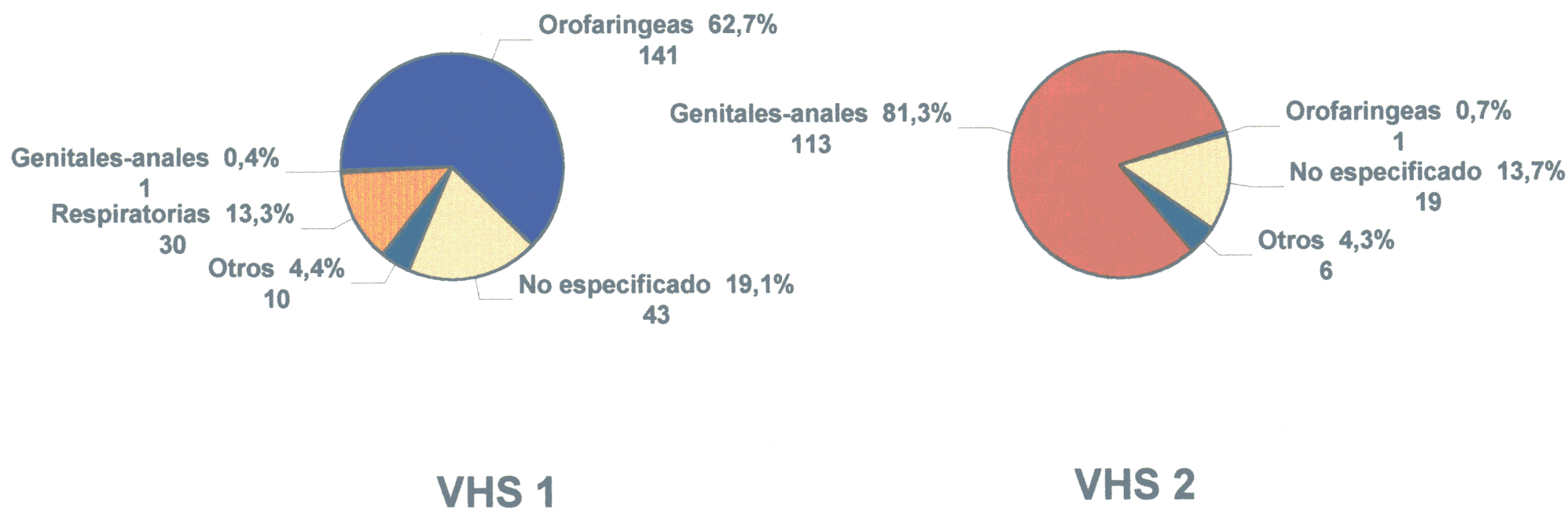
En total, de los 401 VHS detectados desde septiembre de 1991 hasta diciembre de 1995 se obtuvieron 226 VHS-1, 139 VHS-2 y 36 que no pudieron ser tipados por varios motivos (se envió al laboratorio un portaobjetos para relizar inmunofluorescencia indirecta, el cultivo se contaminó, la cepa se murió antes de poder tiparla, etc).

Al estudiar el origen de las muestras en función del serotipo del aislado, se observó, como se expresa en la figura 3 y en la tabla VII, que la mayoría de las cepas de VHS-1 eran de muestras orofaríngeas (62,7%) y la mayoría de los VHS-2 de muestras genitales-anales (81,3%).

**FIGURA 2: MUESTRAS EN LAS QUE SE HA DETECTADO PRESENCIA DE VHS EN EL PERIODO 1991-95**



**FIGURA 3: MUESTRAS EN LAS QUE SE HA DETECTADO PRESENCIA DE VHS EN EL PERIODO 1991-95. DISTRIBUCION SEGUN SEROTIPO**



**TABLA VII:** Número de aislados según el origen de la muestra y el serotipo de VHS.

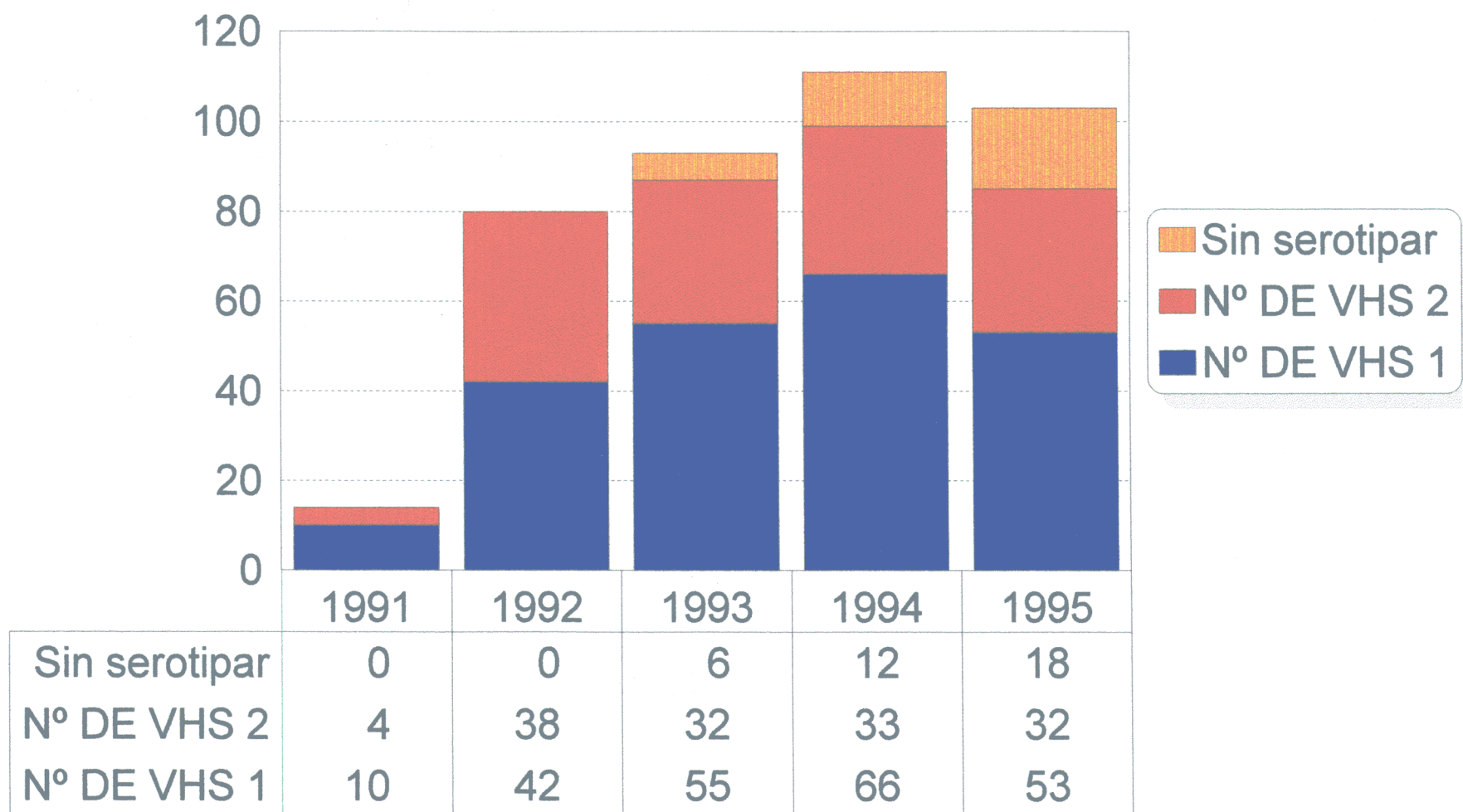
TIPO DE MUESTRA	VHS-1	VHS-2	NO TIPADO	GLOBAL
Orofaringea	141	1	0	142
Genital-Anal	1	113	0	114
Respiratoria	30	0	0	30
Orina	3	4	0	7
Lesión en dedo	3	2	0	5
Biopsia esofágica	2	0	0	2
Lesión en oreja	1	0	0	1
Lesión en pierna	1	0	0	1
Origen no especificado	43	19	37	99
Total	225	139	37	401

#### **4.2.1. Distribucion en el tiempo**

Si se observa la distribución en el tiempo de los 401 VHS diagnosticados en el Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" desde septiembre de 1991 hasta diciembre de 1995, reflejada en la figura 4, se puede observar que , salvo en 1991, la situación parece estable, habiéndose detectado el mayor número de VHS en 1994. En 1991 se obtiene una cifra tan baja de detecciones de VHS ya que fue a finales de ese año cuando comenzó su labor el Laboratorio de Virología, por tanto 1991 y el comienzo de 1992 fue una etapa de puesta a punto del laboratorio.

En la figura 4 queda también reflejada la evolución de los aislados en función de los serotipos y su evolución en el tiempo.

**FIGURA 4: DISTRIBUCION DE LOS AISLADOS DE VHS POR AÑOS**



### **4.3. COMPARACION DE LOS METODOS UTILIZADOS**

Se ha determinado la sensibilidad a antivirales por el método de reducción de placas y por el método de detección rápida de resistencias a antivirales de 84 aislados entre los que están incluidos los aislados que mostraron algún tipo de resistencia por el método rápido.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

#### **ACICLOVIR**

En el caso del aciclovir, 61 aislados fueron sensibles y 21 resistentes por ambos métodos. Dos fueron resistentes por el método rápido y sensibles por el ERP, y no se obtuvo ningún falso negativo (sensible por método rápido y resistente por ERP).

#### **PENCICLOVIR**

Para el penciclovir de los 84 aislados, 54 fueron sensibles y 29 resistentes por los dos métodos. Sólo se obtuvo un aislado discrepante que fue sensible por el método rápido y resistente por el ERP. Este mismo aislado se mostró resistente al repetirle la sensibilidad por el método rápido.

#### **FOSCARNET**

En el caso del foscarnet 81 aislados fueron sensibles por ambos métodos y 3 resistentes. De los aislados resistentes a foscarnet por los dos métodos, uno de ellos tenía una  $CI_{50}$  de 50  $\mu\text{g/ml}$  y los otros dos de 100  $\mu\text{g/ml}$ , según la *American*



*Society for Microbiology (ASM)* un aislado de VHS con una  $CI_{50}$  para el foscarnet realizada por el ERP de 50  $\mu\text{g/ml}$  debe considerarse como de sensibilidad intermedia.

Todos estos datos se pueden resumir en las siguientes tablas:

**TABLA VIII:** Comparación de métodos: ACICLOVIR

		ENSAYO DE REDUCCION DE PLACAS	
		RESISTENTE	SENSIBLE
METODO RAPIDO DE DETECCION DE RESISTENCIAS	RESISTENTE	21	2
	SENSIBLE	0	61

**TABLA IX:** Comparación de métodos: PENCICLOVIR

		ENSAYO DE REDUCCION DE PLACAS	
		RESISTENTE	SENSIBLE
METODO RAPIDO DE DETECCION DE RESISTENCIAS	RESISTENTE	29	0
	SENSIBLE	1	54

**TABLA X:** Comparación de métodos: FOSCARNET

		ENSAYO DE REDUCCION DE PLACAS	
		RESISTENTE	SENSIBLE
METODO RAPIDO DE DETECCION DE RESISTENCIAS	RESISTENTE	3	0
	SENSIBLE	0	81

Con todos estos datos, se obtienen los siguientes valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método rápido respecto al ERP.

**TABLA XI:** Valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el método rápido de detección de VHS resistentes.

	ACICLOVIR	PENCICLOVIR	FOSCARNET
ESPECIFICIDAD (%)	100,0	96,6	100,0
SENSIBILIDAD (%)	96,8	100,0	100,0
VALOR PREDICTIVO POSITIVO (%)	91,3	100,0	100,0
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (%)	100,0	98,2	100,0

Al quedar contrastada la validez del método rápido de detección de resistencias, frente al método tradicionalmente considerado como estándar (ERP), se continuó el estudio utilizando el método rápido y el ERP se utilizó para confirmar

la resistencia en cepas resistentes, así como en cepas con sospecha clínica de resistencia a aciclovir, pero que con el método rápido se mostraron como sensibles a este antiviral *in vitro*.

#### **4.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD**

Durante el periodo de tiempo desde septiembre de 1991 a diciembre de 1995, se detectó presencia de VHS en 401 muestras enviadas al Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del HGUGM. De estos 401 aislados fue posible realizar la sensibilidad de 229 aislados que correspondieron a 219 pacientes.

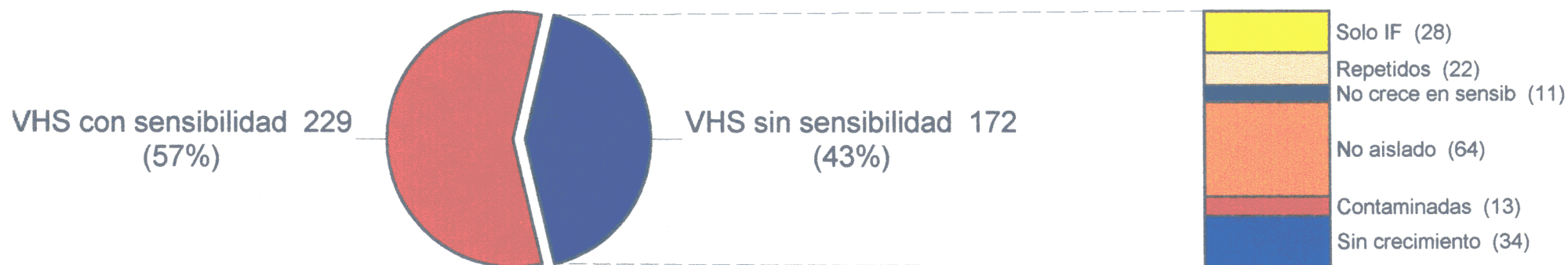
Hubo 172 aislados a los que no se les realizó la determinación de la sensibilidad por diversos motivos, resumidos en la figura 5.

##### **4.4.1. Datos generales de la muestra de VHS estudiada**

Se ha realizado la determinación de la sensibilidad por el método rápido a 229 VHS, correspondientes a 219 pacientes, todos ellos aislados entre septiembre de 1991 y diciembre de 1996. De éstos, 113 aislados correspondieron a pacientes infectados por el VIH y 116 a pacientes no infectados por el VIH.

De los 229 aislados estudiados, el grupo mayoritario fueron los procedentes de muestras orofaríngeas (n = 79) y los procedentes de muestras genitales-anales

**FIGURA 5: MUESTRAS ESTUDIADAS/NO ESTUDIADAS**



**Numero total de VHS: 401**

(n = 66). Seis aislados estudiados procedían de muestras de orinas. Procedentes de muestras respiratorias se han estudiado 10 aislados de VHS-1. También se han estudiado ocho aislados de muestras variadas (oreja, dedo, pierna, etc); y 60 aislados procedentes de diversas lesiones herpéticas sin especificar. En la tabla XII y en las figuras 5 y 6 se detallan el origen de los aislados así como su serotipo.

**TABLA XII:** Distribución de la muestra estudiada según serotipos y origen.

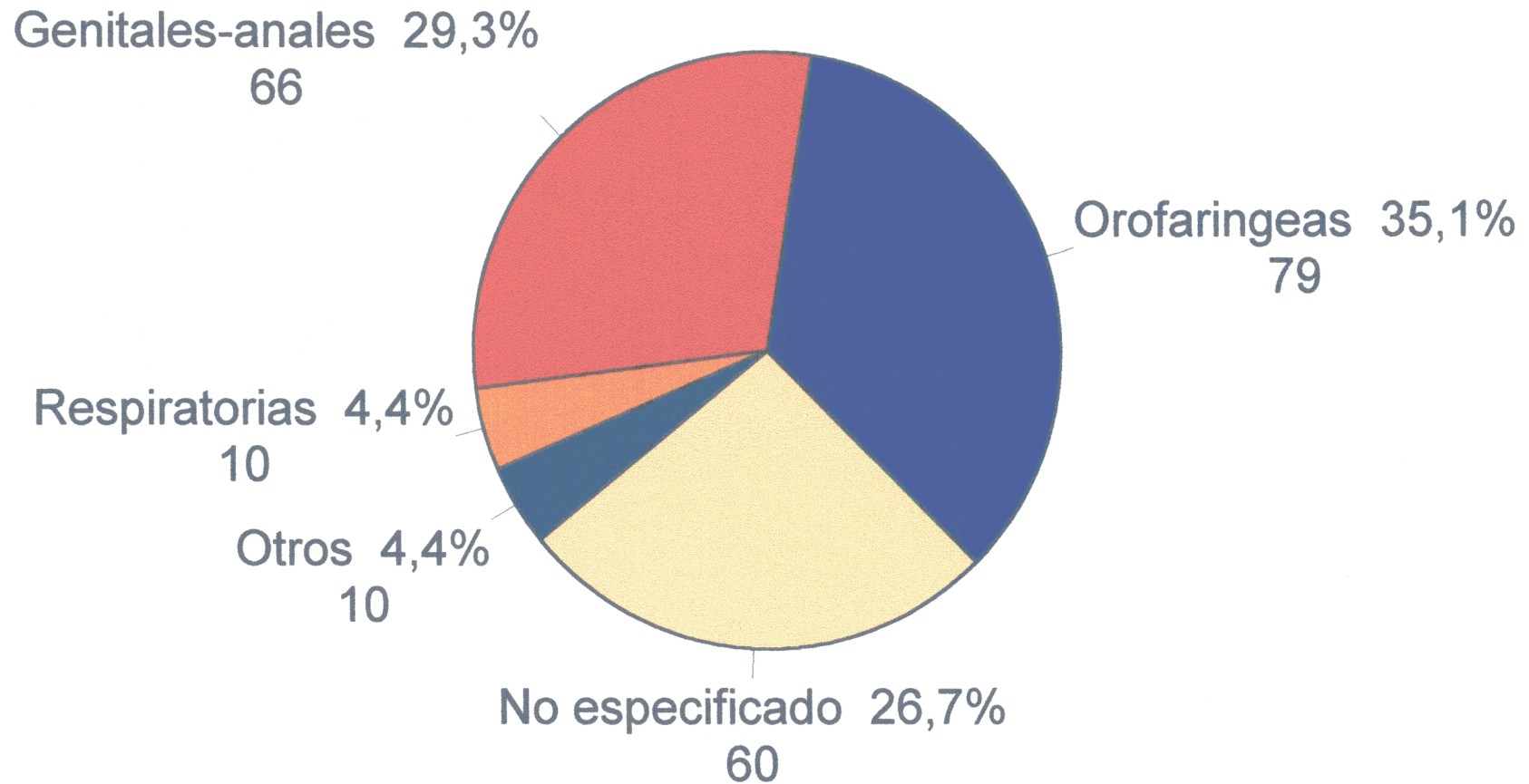
Tipo de muestra	VHS-1	VHS-2	TOTAL
Orofaringeas	78	1	79
Anales-genitales	0	66	66
Orina	2	4	6
Muestras respiratorias	10	0	10
Otros	7	1	8
Exudados sin especificar	41	19	60
Total	138	91	229

En la figura 7 y en la tabla XIII quedan detallados la distribución en el tiempo de los aislados de VHS estudiados según el serotipo, así como la procedencia o no de pacientes infectados por el VIH.

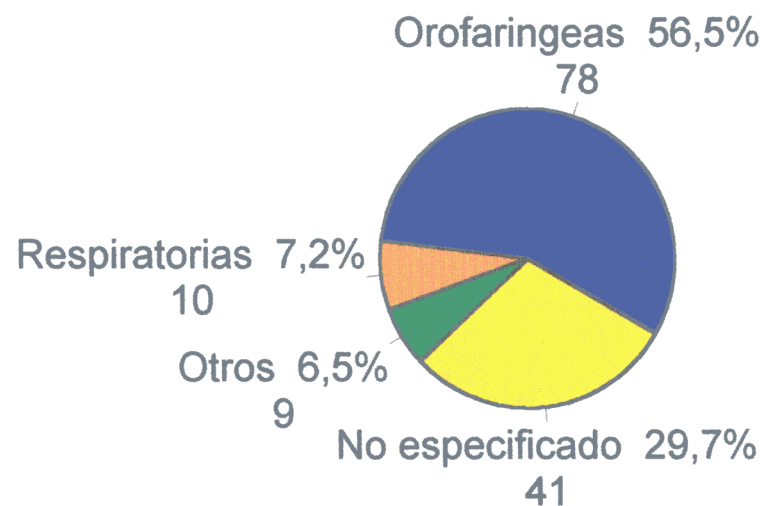
**TABLA XIII:** Distribución por años, serotipo y tipo de paciente de procedencia de los aislados de VHS estudiados.

AÑOS	TOTAL	HIV +			HIV -		
		VHS-1	VHS-2	VHS-1 + VHS-2	VHS-1	VHS-2	VHS-1 + VHS-2
1991	8	3	0	3	5	0	5
1992	47	6	14	20	18	9	27
1993	61	11	21	32	25	4	29
1994	49	10	16	26	18	5	23
1995	64	18	14	32	21	11	32

**FIGURA 6: MUESTRA ESTUDIADA. DISTRIBUCION POR ORIGENES**

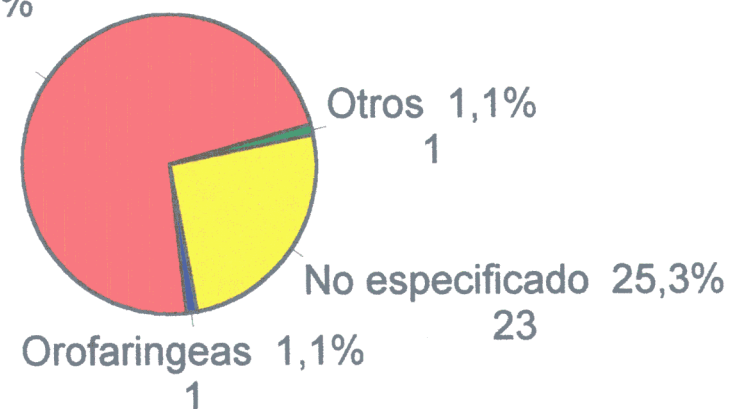


**FIGURA 7: MUESTRA ESTUDIADA. DISTRIBUCION SEGUN ORIGEN DE LA MUESTRA Y SEROTIPO DEL VHS**



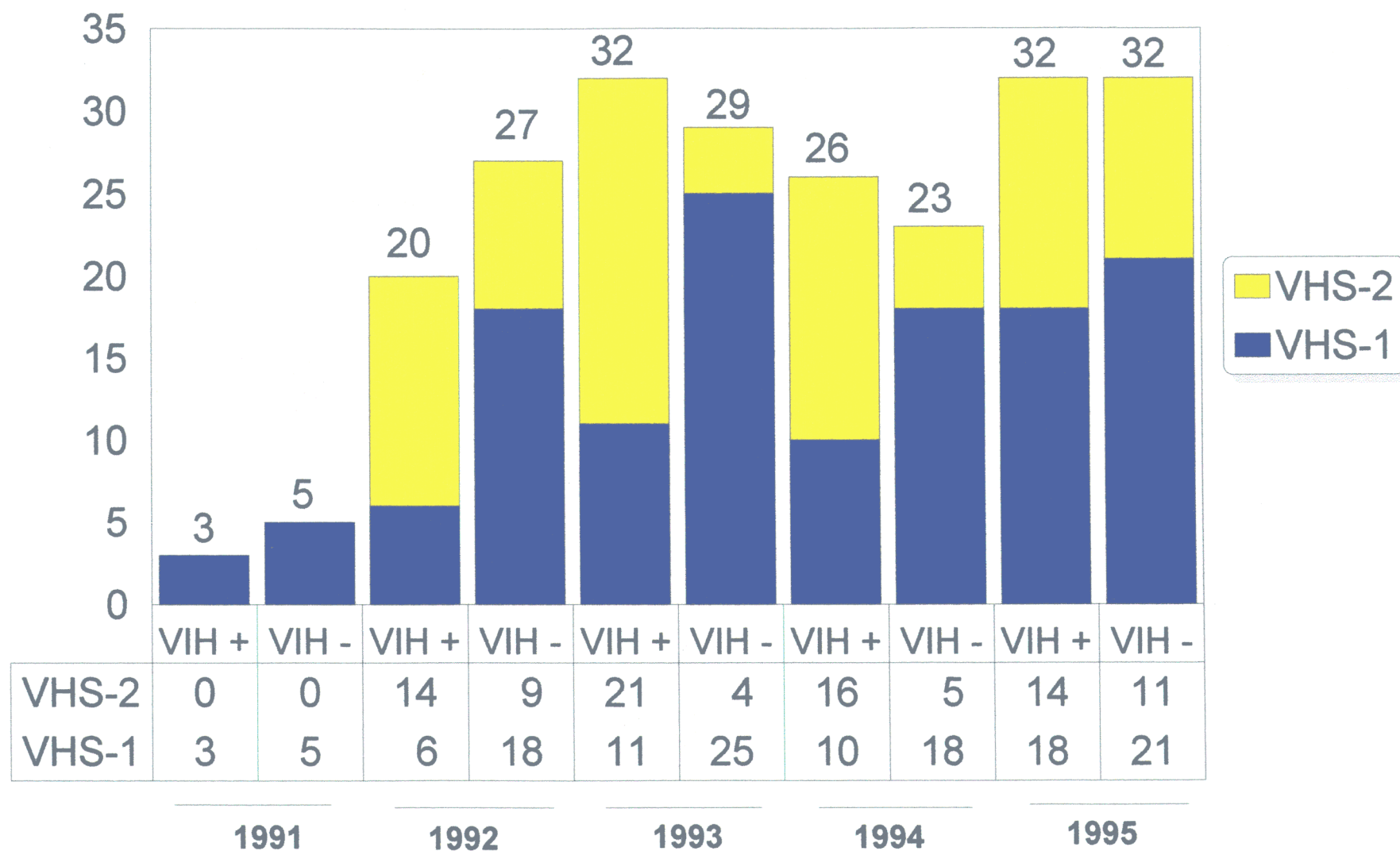
VHS 1

Genitales-anales 72,5%  
66



VHS 2

**FIGURA 8: MUESTRA ESTUDIADA: DISTRIBUCION POR AÑOS Y POR PACIENTES VIH+ Y VIH-**





En lo referente a los 116 aislados procedentes de pacientes no infectados por el VIH, éstos procedían de pacientes con diversas enfermedades de base, siendo la mayoría de ellos de transplantados cardíacos ( $n = 41$ ), hepáticos ( $n = 12$ ) o pacientes en los que no se indica enfermedad de base en la petición al laboratorio ( $n = 49$ ) tal y como se aprecia en la figura 9.

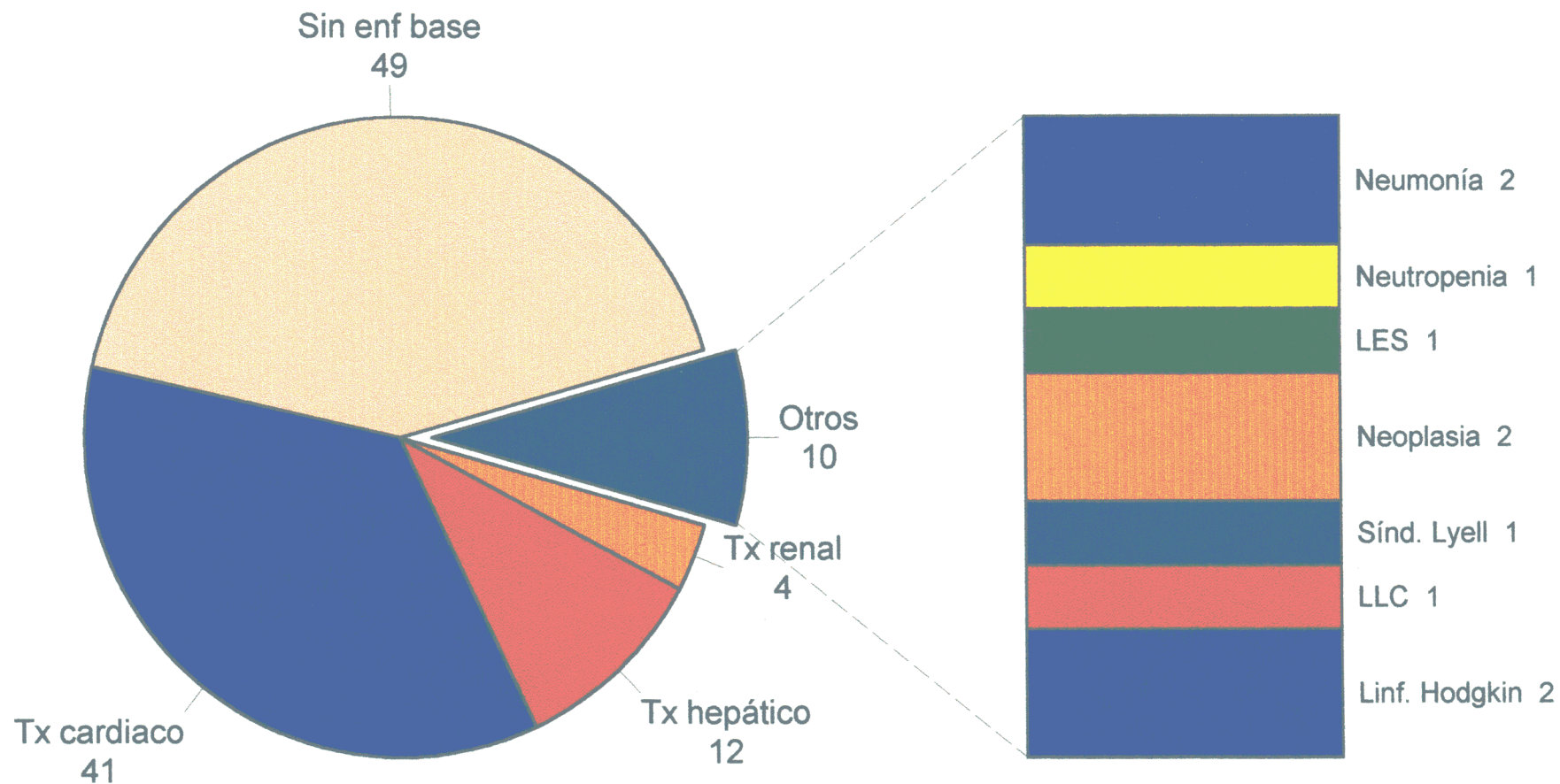
#### **4.4.2. Resultados globales de sensibilidad**

De las 229 cepas de VHS estudiadas, 23 (10,04%) fueron resistentes a aciclovir y penciclovir, y 3 (1,31%) fueron resistentes a los tres antivirales probados. A todas las cepas resistentes, se les determinó también la sensibilidad por el método de reducción de placas para confirmar la resistencia detectada por el método rápido. En caso de discrepancias entre los dos métodos, se tomó como verdadero el resultado obtenido por el método de reducción de placas, ya que es uno de los métodos tradicionalmente considerado como estándar.

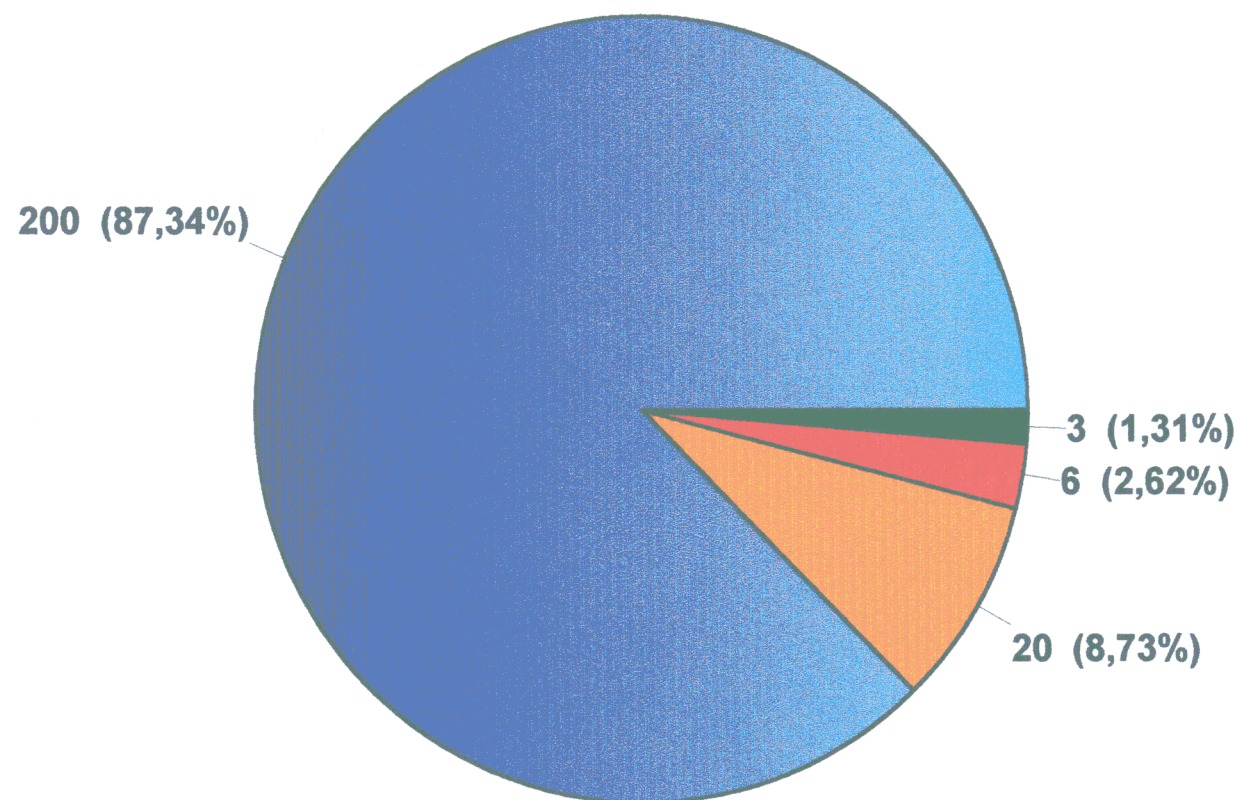
Los datos globales de sensibilidad pueden apreciarse en la tabla XIV y en la figura 10.

En las figuras 10, 11, 12 y 13, así como en las tablas XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX Y XXI, las siglas ACV, PCV y FOS corresponden a aciclovir, penciclovir y foscarnet, respectivamente.

**FIGURA 9: ENFERMEDADES DE BASE DE LOS PACIENTES VIH- CON AISLADOS DE VHS ESTUDIADOS**



**FIGURA 10: RESULTADOS GLOBALES DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD**



■ ACV S, PCV S, FOS S ■ ACV R, PCV R, FOS S  
■ ACV S, PCV R, FOS S ■ ACV R, PCV R, FOS R

**Nº TOTAL DE VHS ESTUDIADOS: 229**

**TABLA XIV:** Resultados globales de sensibilidad.

Patrón de resistencia	Nº de cepas (n = 229)	Porcentaje (%)
ACV S PCV S FOS S	200	87,34
ACV S PCV R FOS S *	6	2,62
ACV R PCV R FOS S	20	8,73
ACV R PCV R FOS R	3	1,31

\* Posteriormente se demuestra en el estudio que las cepas resistentes únicamente a penciclovir, son en realidad sensibles y éste resultado se trata de una interferencia con la línea celular utilizada.

#### **4.4.3. Resultados de sensibilidad según los serotipos de los aislados**

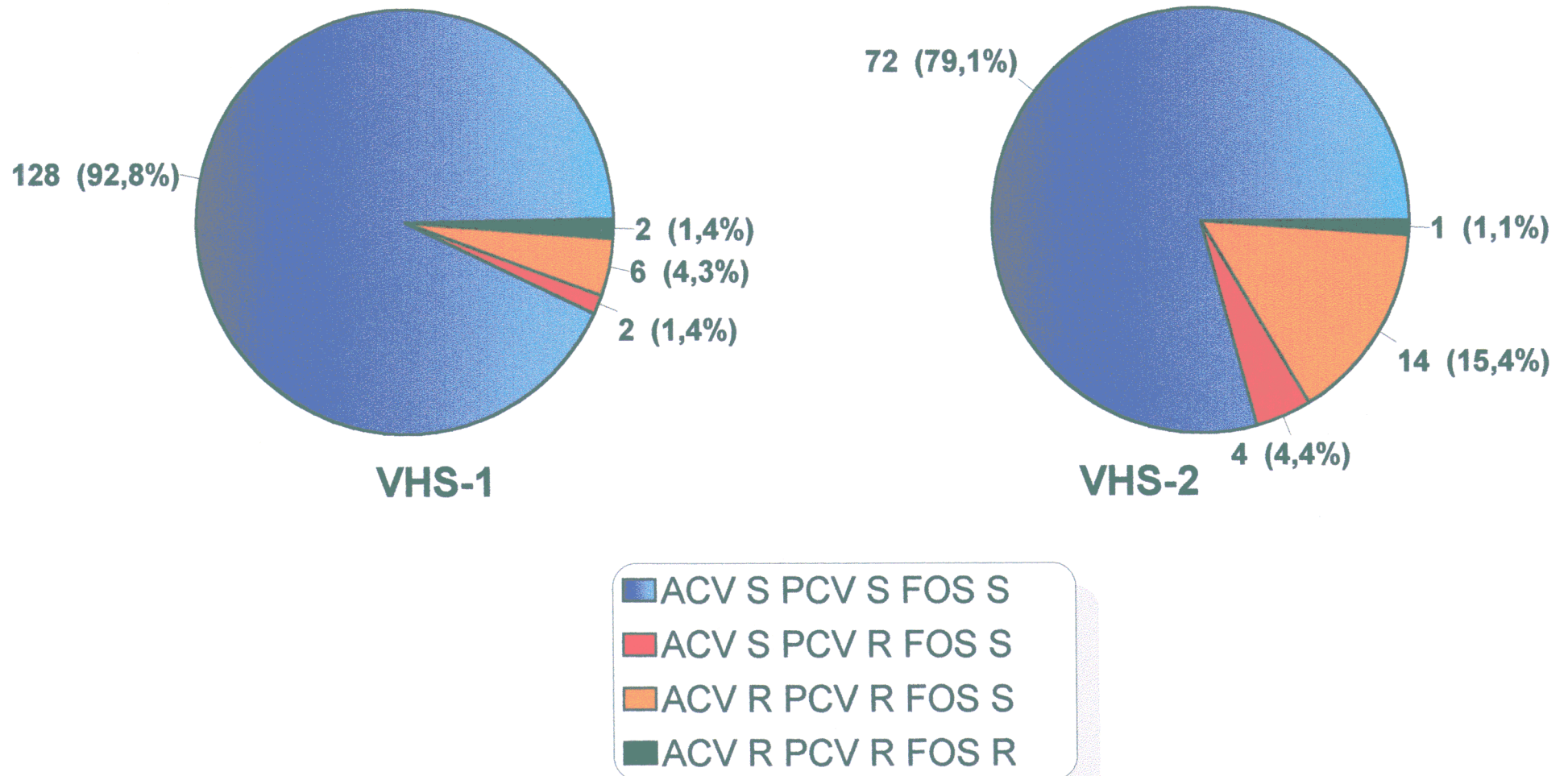
Se ha estudiado la sensibilidad de 138 aislados de VHS-1 y de 91 aislados de VHS-2.

Si nos centramos en los VHS-1, se obtienen 8 VHS resistentes a aciclovir (2 de ellos resistentes también a foscarnet), siendo la mayoría de ellos procedentes de muestras orofaríngeas (n = 4).

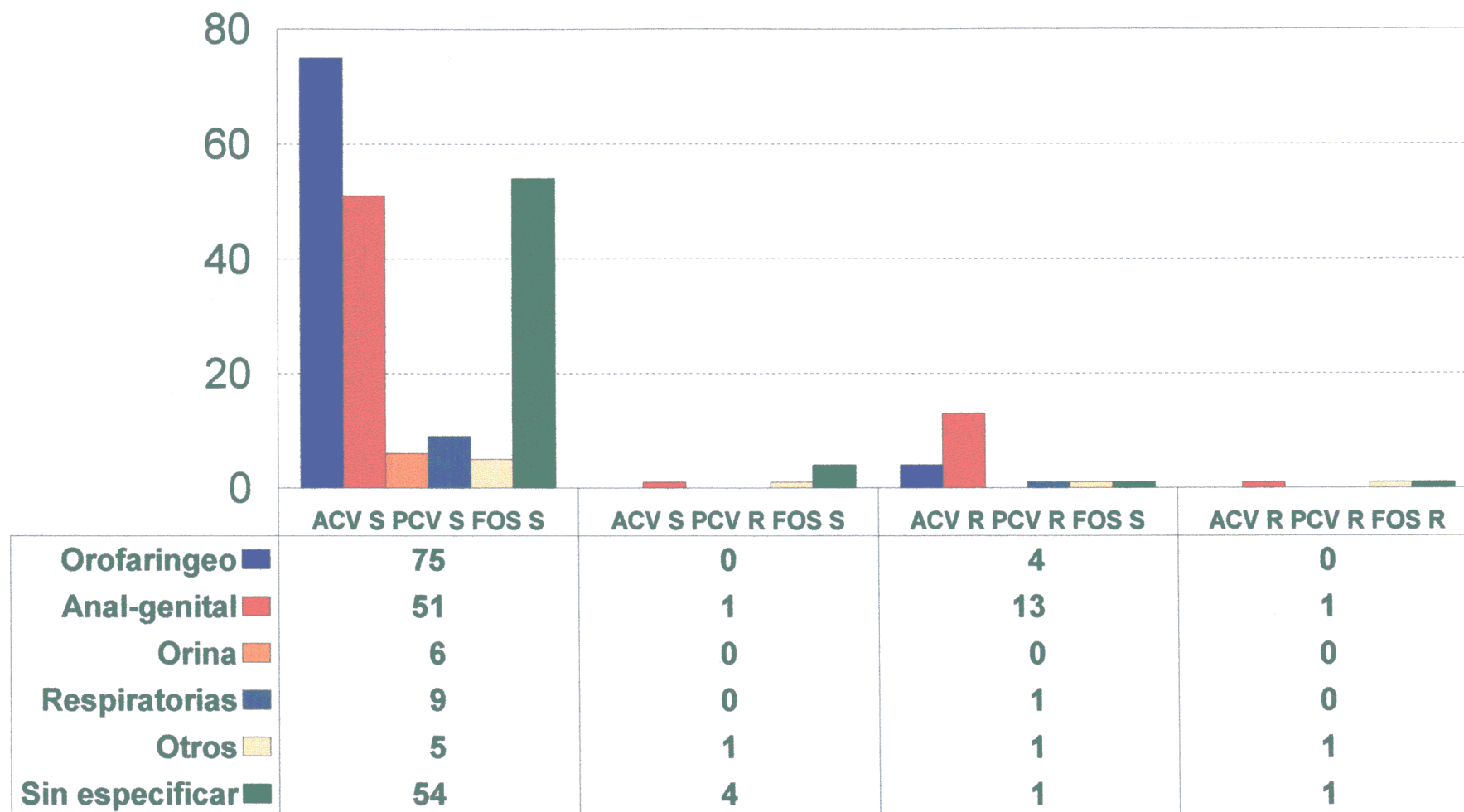
En el caso de los VHS-2, son 15 los VHS resistentes a aciclovir y el origen mayoritario de éstos VHS-2 resistentes es el genital-anal (n = 13).

Todos estos datos quedan detallados en la tabla XV y en las figuras 11 y 12.

**FIGURA 11: RESULTADO DE LA SENSIBILIDAD SEGUN EL SEROTIPO**



**FIGURA 12: RESULTADO DE SENSIBILIDAD SEGUN LA MUESTRA**





**TABLA XV:** Sensibilidad de los aislados según su origen y su serotipo.

Tipo de muestra		ACV-S	ACV-R	ACV-S	ACV-R	Total de	Total
		PCV-S	PCV-R	PCV-R	PCV-R	cada	(VHS-1 + VHS-2)
		FOS-S	FOS-S	FOS-S	FOS-R	serotipo	
Orofaringeas	VHS-1	74	4	0	0	78	79
	VHS-2	1	0	0	0	1	
Genitales- Anales	VHS-1	0	0	0	0	0	66
	VHS-2	51	13	1	1	66	
Orina	VHS-1	2	0	0	0	2	6
	VHS-2	4	0	0	0	4	
Muestras respiratorias	VHS-1	9	1	0	0	10	10
	VHS-2	0	0	0	0	0	
Otros	VHS-1	5	0	1	1	7	8
	VHS-2	0	1	0	0	1	
Exudados sin especificar	VHS-1	38	1	1	1	41	60
	VHS-2	16	0	3	0	19	

#### **4.4.4. Resultados de sensibilidad según aislados procedentes de pacientes infectados o no infectados por el VIH**

De las 229 cepas estudiadas, 124 procedían de pacientes VIH positivos y 105 de pacientes VIH negativos.

Si estudiamos los resultados de sensibilidad de las cepas de VHS haciendo

esta diferencia se obtienen los siguientes datos:

#### **4.4.4.a. Resultados de sensibilidad de los aislados de pacientes infectados por el VIH**

De las 124 cepas correspondientes a pacientes infectados por el VIH, 108 no presentaron ningún tipo de resistencia a los antivirales estudiados y 16 sí, lo que representó el 12,90% de las cepas. Entre estas 3 cepas resistentes estaban las tres resistentes a los tres antivirales estudiados. Estos datos quedan detallados en la siguiente tabla XVI y en la figura 13.

**TABLA XVI:** Resultados de sensibilidad de los aislados de pacientes VIH positivos.

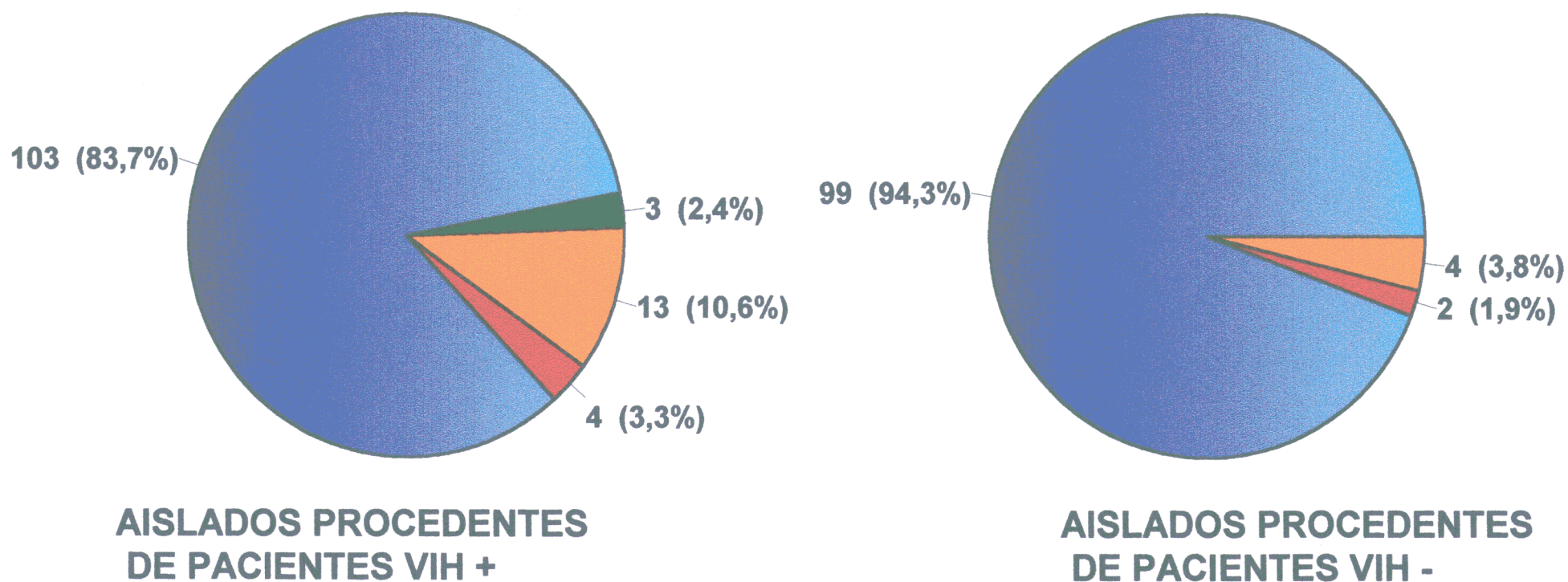
Patrón de resistencia	Nº de cepas	Porcentaje
ACV S PCV S FOS S	104	83,87
ACV S PCV R FOS S *	4	3,23
ACV R PCV R FOS S	13	10,48
ACV R PCV R FOS R	3	2,42

\* Posteriormente se demuestra en el estudio que las cepas resistentes únicamente a penciclovir, son en realidad sensibles y éste resultado se trata de una interferencia con la línea celular utilizada.

Si tenemos en cuenta el serotipo de los 124 aislados de VHS estudiados procedentes de pacientes VIH positivos, se obtiene que se han estudiado 57 VHS-1



**FIGURA 13: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE VHS A ANTIVIRALES EN FUNCION DE SI PROCEDEN DE PACIENTES VIH + O VIH -**



- ACV S PCV S FOS S
- ACV S PCV R FOS S
- ACV R PCV R FOS S
- ACV R PCV R FOS R

y 67 VHS-2 y la mayoría de VHS resistentes a aciclovir se obtienen entre los aislados de VHS-2.

**TABLA XVII:** Patrones de resistencia de aislados de pacientes VIH positivos según el serotipo del VHS.

Patrón de resistencia	HSV-1	HSV-2
ACV S	51	51
PCV S		
FOS S		
ACV S	0	4
<b>PCV R</b>		
FOS S *		
<b>ACV R</b>	4	11
<b>PCV R</b>		
FOS S		
<b>ACV R</b>	2	1
<b>PCV R</b>		
<b>FOS R</b>		

\* Posteriormente se demuestra en el estudio que las cepas resistentes únicamente a penciclovir, son en realidad sensibles y éste resultado se trata de una interferencia con la línea celular utilizada.

#### **4.4.4.b. Resultados de sensibilidad de los aislados de pacientes no infectados por el VIH**

De las cepas estudiadas, 105 correspondieron a cepas de VHS aisladas de muestras de pacientes no infectados por el VIH y que tenían otras enfermedades de base o bien ninguna enfermedad reseñable. En estas cepas hubo 7 que fueron resistentes a aciclovir y penciclovir y 2 sólo a penciclovir, las 96 cepas restantes no presentaron ninguna resistencia a los antivirales probados. Estos mismos datos se pueden ver de manera más gráfica en la tabla XVIII.

**TABLA XVIII:** Patrones de resistencia de aislados de pacientes VIH negativos.

Patrón de resistencia	Nº de cepas	Porcentaje
ACV S PCV S FOS S	96	91,43
ACV S <b>PCV R</b> FOS S *	2	1,90
<b>ACV R</b> <b>PCV R</b> FOS S	4	3,81
<b>ACV R</b> <b>PCV R</b> <b>FOS R</b>	0	0

\* Posteriormente se demuestra en el estudio que las cepas resistentes únicamente a penciclovir, son en realidad sensibles y éste resultado se trata de una interferencia con la línea celular utilizada.

Las 7 cepas resistentes a aciclovir y a penciclovir correspondieron a 7 pacientes de los cuales 2 eran transplantados hepáticos, uno transplantado cardiaco, un paciente con neoplasia, un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y dos pacientes sin enfermedad de base conocida.

Atendiendo al serotipo de éstos aislados, se observa que hubo 80 VHS-1 estudiados, de los que 4 fueron resistentes a aciclovir y penciclovir, y 25 VHS-2 de los que 3 fueron resistentes a aciclovir y penciclovir. Estos datos quedan reflejados en la tabla XIX.

**TABLA XIX:** Patrones de resistencia de aislados de pacientes VIH negativos según el serotipo del VHS.

Patrón de resistencia	HSV-1	HSV-2
ACV S		
PCV S	74	22
FOS S		
ACV S		
PCV R	2	0
FOS S *		
ACV R		
PCV R	4	3
FOS S		
ACV R		
PCV R	0	0
FOS R		

\* Posteriormente se demuestra en el estudio que las cepas resistentes únicamente a penciclovir, son en realidad sensibles y éste resultado se trata de una interferencia con la línea celular utilizada.

#### **4.4.5. Comprobación de las cepas resistentes únicamente a penciclovir.**

Como se ha indicado anteriormente, se obtuvieron 6 cepas sensibles a aciclovir y foscarnet pero resistentes a penciclovir, tanto por el método rápido como por el método de reducción de placas en células Vero. A estas cepas se les determinó la sensibilidad por ambos métodos, pero utilizando la línea celular MRC-5. En este caso, ninguna de las cepas resultó resistentes a penciclovir y todas ellas fueron sensibles a los tres antivirales. Para la realización de esta prueba se utilizaron las mismas cepas control que en el estudio general.

#### **4.5. RESULTADOS DE LA REVISION DE LAS HISTORIAS CLINICAS**

Las 23 cepas de VHS resistentes a aciclovir correspondieron a 21 pacientes,

de los cuales se tuvo acceso a la historia clínica de 15 de ellos. Las historias correspondieron a 12 pacientes VIH positivo y a 3 VIH negativo.

#### **4.5.1. Descripción de los pacientes**

##### **4.5.1.a. Pacientes VIH negativo**

Las historias revisadas de pacientes VIH negativo pertenecían a 2 pacientes transplantados (1 transpalnte hepático y 1 transplante cardiaco) en tratamiento con altas dosis de corticoides por rechazo. El tercer paciente era un varón de 77 años bronquítico crónico en tratamiento de mantenimiento con corticoides. Los tres pacientes evolucionaron favorablemente con tratamiento con aciclovir a dosis estándar y no se refieren nuevos episodios en la historia.

##### **4.5.1.b. Pacientes VIH positivos**

Revisamos 12 historias de pacientes VIH positivos con aislados de VHS resistentes a aciclovir. Se seleccionó como grupo control, un grupo de 12 pacientes VIH positivos con aislamientos de VHS sensibles a aciclovir.

Las características de ambos grupos quedan reflejadas en la tabla XX.

**TABLA XX:** Características clínicas de los pacientes VIH positivos con aislados de VHS resistentes a aciclovir y del grupo control.

	<b>ACV R (n = 12)</b>	<b>ACV S (n = 12)</b>	
<b>EDAD MEDIA (rango)</b>	33 (21-52)	38 (27-56)	
<b>SEXO (V/M)</b>	6/6	9/4	
<b>MEDIA CD4/mm<sup>3</sup> (rango)</b>	44 (6-160)	62 (4-306)	
<b>FACTOR DE RIESGO</b>			
- Homosexualidad	4 (33,3%)	4 (33,3%)	
- Heterosexualidad	3 (25%)	0	
- ADVP	5 (41,7%)	5 (41,7%)	
- Desconocido	0	3 (25%)	
<b>TRATAMIENTO PREVIO CON ACV</b>	11 (91,7%)	1 (8,3%)	p<0,001
<b>TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO CON ACV</b>	7 (58,3%)	0	p<0,001
<b>TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR</b>	5 (41,7%)	0	p<0,01
<b>VHS1/VHS2</b>	2/10	4/8	
<b>LOCALIZACION</b>			
- Oral-perioral	3	3	
- Genital-anal	8	8	
- Diseminado	1	0	
- Desconocida	0	1	
<b>DIAGNOSTICO DE SIDA PREVIO AL AISLAMIENTO DEL VHS</b>	12	11	
<b>EVOLUCION CON ACV</b>			
- Curación	4	12	
- Mejoría	1	0	
- Cronificación	5	0	
- Empeoramiento	2	0	

Como se observa en la tabla, todos los pacientes VIH positivos con VHS resistente a aciclovir tenían una cifra de CD4 menor de 200/mm<sup>3</sup> y todos habían padecido una enfermedad definitoria de SIDA (estadío C3). El 91,7% de ellos había

recibido tratamiento con ACV por otros episodios por VHS y más de la mitad estaba recibiendo aciclovir de mantenimiento en el momento en que se aisló el VHS. En más de la mitad de los pacientes las lesiones evolucionaron de una manera tórpida y ulcerativa hacia la cronificación o empeoramiento, a pesar del tratamiento con ACV.

**TABLA XXI:** Datos de todas las cepas de VHS estudiadas.

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
1	1991	823	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
2	1991	354	M	NEFROLOGIA	TXR	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/25
3	1991	249	H	DERMATOLOGIA	DESCONOCIDA	VESICULAS	VHS 1	S/S/S	
4	1991	285	H	DIGESTIVO	TXH	L.B.A.	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/12,5
5	1991	364	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
6	1991	846	H	DIGESTIVO	TXH	L. PALADAR	VHS 1	S/S/S	
7	1991	697	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
8	1991	255	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,5/12,5
9	1992	473	M	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
10	1992	125	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GLUTEO	VHS 2	S/S/S	0,25/0,5/12,5
11	1992	215	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. PALADAR	VHS 1	S/S/S	
12	1992	684	H	INFECCIOSAS	VIH	L. LABIO	VHS 1	S/S/S	
13	1992	668	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 2	S/S/S	
14	1992	378	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
15	1992	581	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,5/12,5
16	1992	275	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/12,5
17	1992	829	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENTALES	VHS 2	S/R/S	1/5/12,5
18	1992	399	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
19	1992	730	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
20	1992	203	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	



**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
21	1992	678	H	CARDIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. NARIZ	VHS 1	S/S/S	
22	1992	471	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
23	1992	554	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
24	1992	470	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/6,25
25	1992	548	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,12/0,12/3,12
26	1992	542	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	ULCERA	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/3,12
27	1992	428	M	DIGESTIVO	TXH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/12,5
28	1992	226	M	CARDIOLOGIA	ENF CARDIACA	L. INGUINALES	VHS 2	S/S/S	0,12/0,12/3,12
29	1992	828	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
30	1992	472	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
31	1992	813	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
32	1992	475	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	R/R/S	0,5/2/6,25
33	1992	556	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,12/0,12/6,25
34	1992	740	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,5/2/12,5
35	1992	345	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
36	1992	135	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/R	≥8/≥8/100
37	1992	867	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,12/6,25
38	1992	831	M	INFECCIOSAS	VIH	L. DEDOS	VHS 2	R/R/S	4/4/3,12
39	1992	692	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	R/R/S	≥8/4/6,25
40	1992	883	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
41	1992	893	H	NEUROLOGIA	DESCONOCIDA	TEJIDO	VHS 1	S/S/S	0,25/0,12/3,12
42	1992	685	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
43	1992	120	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	R/R/S	2/2/6,25
44	1992	123	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,5/6,25
45	1992	154	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
46	1992	892	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	R/R/S	4/4/3,12
47	1992	343	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
48	1992	156	M	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
49	1992	151	H	DIGESTIVO	TXH	L. PALADAR	VHS 1	S/S/S	
50	1992	19	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. LABIO	VHS 1	S/S/S	
51	1992	344	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. ESCROTO	VHS 2	S/S/S	0,5/0,5/6,25
52	1992	882	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/6,25
53	1992	694	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
54	1992	536	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
55	1992	93	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
56	1993	864	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	2/2/3,12
57	1993	375	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
58	1993	369	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
59	1993	807	H	INFECCIOSAS	VIH	ORINA	VHS 1	S/S/S	0,5/0,5/25
60	1993	361	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
61	1993	768	H	ONCOLOGIA	NEUTROPENIA	L. ORAL	VHS 1	S/S/S	
62	1993	759	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,12/0,12/6,25
63	1993	574	H	NEUMOLOGIA	EPOC	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	2/4/6,25
64	1993	718	M	URGENCIAS	DESCONOCIDA	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,25/6,25
65	1993	494	M	C.O.T.	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	0,25/0,25/6,25
66	1993	696	M	NEFROLOGIA	SIND. DE LYELL	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
67	1993	690	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,5/1/25
68	1993	1	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
69	1993	671	M	ONCOLOGIA	LLC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
70	1993	608	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 1	S/S/S	
71	1993	593	M	DIGESTIVO	TXH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,25/1/25
72	1993	578	M	UCI	DESCONOCIDA	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,25/12,5
73	1993	311	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	1/1/3,12
74	1993	552	H	INFECCIOSAS	VIH	L. DEDO	VHS 1	S/S/S	0,5/1/3,12
75	1993	541	M	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
76	1993	500	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	0,12/0,25/3,12
77	1993	726	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/3,12
78	1993	161	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 2	S/S/S	
79	1993	143	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
80	1993	388	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/25

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
81	1993	458	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,12/0,25/12,5
82	1993	875	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
83	1993	522	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/3,12
84	1993	870	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/1/6,25
85	1993	580	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/6,25
86	1993	510	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
87	1993	646	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
88	1993	700	M	M. INTERNA	DESCONOCIDA	BIOPSIA TEJIDO	VHS 1	S/S/S	
89	1993	841	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,12/25
90	1993	842	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	
91	1993	849	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,5/12,5
92	1993	857	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,12/0,12/3,12
93	1993	877	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	S/S/S	
94	1993	782	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
95	1993	715	M	DIGESTIVO	TXH	LBA	VHS 1	R/R/S	4/≥8/3,12
96	1993	148	H	INFECCIOSAS	VIH	LBA	VHS 1	S/S/S	
97	1993	315	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEA	VHS 2	S/S/S	
98	1993	128	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,5/0,25/6,25
99	1993	247	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
100	1993	316	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
101	1993	145	H	UCI	DESCONOCIDA	C.T.	VHS 1	S/S/S	
102	1993	111	H	INFECCIOSAS	VIH	BIOP. ESOFAGO	VHS 1	S/S/S	
103	1993	271	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	0,25/0,25/12,5
104	1993	127	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/1/25
105	1993	52	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,5/1/25
106	1993	91	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,25/0,5/25
107	1993	195	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,5/6,25
108	1993	254	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
109	1993	114	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 2	S/S/S	
110	1993	26	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/12,5
111	1993	272	M	UCI	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
112	1993	4	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,12/0,12/3,12
113	1993	124	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,25/6,25
114	1993	301	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
115	1993	310	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	0,25/0,25/3,12
116	1993	87	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
117	1993	596	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,5/0,5/25
118	1993	1186	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	S/S/S	
119	1994	1170	M	INFECCIOSAS	VIH	ABSCESO	VHS 1	S/S/S	
120	1994	809	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
121	1994	776	H	UCI	LINF. HODGKIN	C.T.	VHS 1	S/S/S	
122	1994	1163	M	MICROBIOLOGÍA	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
123	1994	1157	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
124	1994	1153	H	CARDIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
125	1994	1147	M	NEUMOLOGIA	ASMA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
126	1994	939	H	INFECCIOSAS	VIH	L.FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
127	1994	965	H	MICROBIOLOGÍA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
128	1994	963	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
129	1994	960	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
130	1994	949	M	MICROBIOLOGÍA	DESCONOCIDA	L. PIERNA	VHS 1	S/R/S	1/2/12,5
131	1994	938	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
132	1994	847	M	NEUROLOGIA	DESCONOCIDA	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
133	1994	934	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
134	1994	758	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,5/6,25
135	1994	814	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
136	1994	1013	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
137	1994	964	H	NEFROLOGIA	TXR	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	0,12/0,5/12,5
138	1994	62	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. OREJA	VHS 1	S/S/S	
139	1994	778	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/R/S	1/4/25
140	1994	940	H	DIGESTIVO	TXH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,12/0,25/6,25

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
141	1994	113	M	INFECCIOSAS	VIH	BIOPSIA PIEL	VHS 1	R/R/S	≥8/≥8/6,25
142	1994	257	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
143	1994	1152	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/R/S	1/4/6,25
144	1994	1154	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/R/S	1/2/12,5
145	1994	1127	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
146	1994	329	H	CARDIOLOGIA	TXC	ORINA	VHS 2	S/S/S	0,12/0,25/3,12
147	1994	324	H	CARDIOLOGIA	TXC	ORINA	VHS 2	S/S/S	
148	1994	1123	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
149	1994	88	H	INFECCIOSAS	VIH	L. PERIANALES	VHS 2	S/S/S	
150	1994	1156	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
151	1994	1159	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	R/R/S	≥8/4/6,25
152	1994	1110	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
153	1994	988	H	CARDIOLOGIA	TXC	ORINA	VHS 1	S/S/S	
154	1994	607	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	0,5/1/25
155	1994	1040	M	DIGESTIVO	TXH	ORINA	VHS 2	S/S/S	
156	1994	628	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
157	1994	636	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	S/S/S	
158	1994	159	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	≥8/4/6,25
159	1994	961	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
160	1994	777	H	M. INTERNA	LINF. HODGKIN	LBA	VHS 1	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
161	1994	962	H	DIGESTIVO	TXH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
162	1994	959	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	0,25/0,25/25
163	1994	702	M	INFECCIOSAS	VIH	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
164	1994	756	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
165	1994	1112	H	DIGESTIVO	TXH	LBA	VHS 1	S/S/S	
166	1995	1345	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	
167	1995	1378	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	4/4/12,5
168	1995	1512	M	REANIMACION	DESCONOCIDA	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
169	1995	1410	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
170	1995	1509	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
171	1995	1508	H	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
172	1995	1455	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
173	1995	1276	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	R/R/S	2/4/6,25
174	1995	1513	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
175	1995	1259	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	≥8/≥8/3,12
176	1995	1329	M	UCI	LUPUS	L. CUTANEAS	VHS 1	S/R/S	1/2/12,5
177	1995	1456	M	INFECCIOSAS	VIH	L. MANO	VHS 2	R/R/R	2/≥8/50
178	1995	1213	H	INFECCIOSAS	VIH	LBA	VHS 1	S/S/S	
179	1995	1426	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	R/R/S	4/2/12,5
180	1995	1418	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	



**TABLA XXI (continuación)**

CASO Nº	AÑO	Nº ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
181	1995	1417	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	≥8/≥8/6,25
182	1995	1278	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	R/R/S	
183	1995	1465	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
184	1995	1563	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
185	1995	1413	M	DIGESTIVO	TXH	L. CUTANEAS	VHS 1	S/S/S	
186	1995	1419	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	1/2/3,12
187	1995	1376	M	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
188	1995	1511	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 1	S/S/S	
189	1995	1341	M	DIGESTIVO	TXH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	
190	1995	1454	H	NEFROLOGIA	TXR	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
191	1995	1425	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
192	1995	1263	M	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
193	1995	1411	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. CUTANEAS	VHS 1	S/S/S	
194	1995	1342	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
195	1995	1379	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
196	1995	1301	H	CARDIOLOGIA	TXC	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
197	1995	1361	H	NEFROLOGIA	TXR	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
198	1995	1268	H	CARDIOLOGIA	TXC	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
199	1995	1279	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
200	1995	1323	H	REANIMACION	DESCONOCIDA	LBA	VHS 1	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	CI <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
201	1995	1302	H	INFECCIOSAS	VIH	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	≥ 8/≥ 8/6,25
202	1995	1289	M	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
203	1995	1406	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
204	1995	1325	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
205	1995	1458	M	RECEPCION	DESCONOCIDA	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
206	1995	1287	H	UCI	ENCEFALITIS	C.T.	VHS 1	S/S/S	
207	1995	1271	M	NEUROLOGIA	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
208	1995	1264	M	PEDIATRIA	IMPETIGO	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
209	1995	1262	M	ONCOLOGIA	NEOPLASIA	EXUDADO	VHS 2	S/S/S	
210	1995	1261	H	DERMATOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
211	1995	1260	M	MICROBIOLOGIA	DESCONOCIDA	L. GENITALES	VHS 2	S/S/S	
212	1995	1258	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ANALES	VHS 2	S/S/S	
213	1995	1256	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 2	S/S/S	
214	1995	1282	H	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
215	1995	1396	H	INFECCIOSAS	VIH	L. CUTANEAS	VHS 1	R/R/R	4/≥ 8/100
216	1995	1405	M	M. INTERNA	DESCONOCIDA	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
217	1995	1281	H	INFECCIOSAS	VIH	BIOPSIA	VHS 1	S/S/S	
218	1995	1404	M	INFECCIOSAS	VIH	EXUDADO	VHS 1	S/S/S	
219	1995	1335	H	PEDIATRIA	DESCONOCIDA	ORINA	VHS 2	S/S/S	
220	1995	1390	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	

**TABLA XXI (continuación)**

CASO N°	AÑO	N° ARCH	SEXO	SERVICIO	ENF BASE	MUESTRA	SEROTIPO	ACV/PCV/FOS	Cl <sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS
221	1995	1385	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
222	1995	1381	M	NEFROLOGIA	DESCONOCIDA	L. FARINGEAS	VHS 1	S/S/S	
223	1995	1371	H	ONCOLOGIA	NEOPLASIA	L. GENITALES	VHS 2	R/R/S	2/2/3,12
224	1995	1365	H	INFECCIOSAS	VIH	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	
225	1995	1364	H	INFECCIOSAS	VIH	ABSCESO	VHS 2	S/S/S	
226	1995	1360	H	INFECCIOSAS	VIH	ABSCESO	VHS 1	S/S/S	
227	1995	1355	H	NEUROLOGIA	DESCONOCIDA	L. ORALES	VHS 1	R/R/S	2/2/6,25
228	1995	1354	H	INFECCIOSAS	VIH	L. ORALES	VHS 1	S/S/S	
229	1995	1377	H	INFECCIOSAS	VIH	L. NASALES	VHS 1	S/S/S	

**Caso N°:** número correlativo de caso.

**Año:** año de aislamiento.

**N° Arch:** número con el que está clasificado en la base de datos del Laboratorio de Virología del HGUGM.

**Sexo:** H=hombre, M=mujer.

**Servicio:** UCI=unidad de cuidados intensivos, C.O.T.=cirugía ortopédica y traumatología, M.Interna=medicina interna.

**Enf Base:** enfermedad de base. TXC=transplante cardíaco, TXH=transplante hepático, TXR=transplante renal, VIH= infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, EPOC=enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Sind.=síndrome, LLC=leucemia linfocítica crónica, Linf.=linfoma.

**Muestra:** L.=lesiones, LBA=lavado broncoalveolar, Ex.=exudado, C.T.=catéter telescópico, Biop.=biopsia.

**ACV/PCV/FOS:** sensibilidad *in vitro* a aciclovir/penciclovir/foscarnet obtenida en células Vero. S=sensible, R=resistente.

**Cl<sub>50</sub> (µg/ml) ACV/PCV/FOS:** concentración inhibitoria 50 en µg/ml de aciclovir, penciclovir y foscarnet, realizada en células Vero.

**TABLA XXII:** Datos relevantes de las Historias revisadas.

CASO N°	ARCH	SEXO	ACV	EDAD	VIH	CD4	F. RIESGO	TTO. ACV PREVIO	TTO. MANTENIMIENTO CON ACV	TTO. INMUNOSUPRESOR	TTO. ACV	LOCALIZACION	SIDA	EVOLUCION
1	692	V	R	48	SI	80	HOMO	SI	NO	SI	SI	GENITAL	SI	CURACION
2	1113	M	R	28	SI	38	ADVP	SI	SI	NO	SI	LABIO	SI	MEJORA
3	1426	M	R	35	SI	12	HETERO	SI	NO	NO	SI	GENITAL	SI	EMPEORA
4	1159	H	R	52	SI	160	BISEX	SI	SI	SI	SI	GENITAL	SI	CRONIFICA
5	1276	H	R	35	SI	8	ADVP	SI	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CRONIFICA
6	1302	H	R	40	SI	22	BISEX	SI	SI	NO	SI	GENITAL	SI	CRONIFICA
7	831	M	R	29	SI	33	ADVP	SI	SI	NO	SI	GENITAL	SI	CRONIFICA
8	1278	M	R	24	SI	62	ADVP	SI	NO	NO	SI	ORAL	SI	CURACION
9	864	M	R	24	SI	25	---	NO	SI	SI	SI	DISEMINADO	SI	EMPEORA
10	159	H	R	21	SI	45	---	SI	SI	NO	SI	PERIANAL	SI	CURACION
11	1456	M	R	29	SI	38	ADVP	SI	SI	NO	SI	LABIO	SI	CRONIFICA
12	892	H	R	33	SI	6	HOMO	SI	NO	SI	SI	PERIANAL	SI	CURACION
13	574	H	R	77	NO	---	---	NO	NO	SI	SI	GENITAL	NO (EPOC)	CURACION
14	120	M	R	61	NO	---	---	NO	NO	SI	SI	ORAL	NO (TXC)	CURACION
15	715	M	R	29	NO	---	---	NO	NO	SI	SI	ORAL	NO (TXH)	CURACION
16	114	H	S	31	SI	28	HOMO	NO	NO	NO	SI	PERIANAL	SI	CURACION
17	756	M	S	43	SI	31	ADVP	NO	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CURACION
18	867	H	S	29	SI	91	---	NO	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CURACION
19	813	M	S	56	SI	92	---	NO	NO	NO	SI	ORAL	SI	CURACION
20	963	M	S	39	SI	306	ADVP	NO	NO	NO	SI	GENITAL	NO	CURACION
21	778	H	S	49	SI	27	HOMO	NO	NO	NO	SI	PERIANAL	SI	CURACION
22	1376	M	S	27	SI	4	ADVP	NO	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CURACION
23	1418	H	S	40	SI	30	ADVP	NO	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CURACION
24	1417	H	S	32	SI	30	---	NO	NO	NO	SI	DESCONOCIDA	SI	CURACION

**TABLA XXII (continuación)**

CASO N°	ARCH	SEXO	ACV	EDAD	VIH	CD4	F. RIESGO	TTO. ACV PREVIO	TTO. MANTENIMIENTO CON ACV	TTO. INMUNOSUPRESOR	TTO. ACV	LOCALIZACION	SIDA	EVOLUCION
25	960	H	S	28	SI	30	---	NO	NO	NO	SI	GENITAL	SI	CURACION
26	1282	H	S	36	SI	55	ADVP	SI	NO	NO	SI	ORAL	SI	CURACION
27	939	H	S	45	SI	30	HOMO	NO	NO	NO	NO	NASAL	SI	CURACION

Caso n°: número correlativo de caso.

Arch: número con el que está clasificada la ficha del paciente en el archivo del Laboratorio de Virología del HGUGM.

Sexo: H = hombre, M = mujer

ACV: sensibilidad *in vitro* al aciclovir: S = sensible, R = resistente.

VIH: indica si el paciente está infectado por el VIH o no.

CD4: se indican los CD4/mm<sup>3</sup> en el momento del brote herpético.

F. Riesgo: se indica el factor de riesgo para la infección por VIH. HOMO = homosexual, HETERO = heterosexual, BISEX = bisexual, ADVP = adicto a drogas por vía parenteral, --- = desconocido.

TTO. ACV PREVIO: tratamiento previo con aciclovir.

TTO. MANTENIMIENTO CON ACV: tratamiento de mantenimiento con aciclovir.

TTO. INMUNOSUPRESOR: tratamiento inmunosupresor.

TTO. ACV: tratamiento con aciclovir del brote actual.

SIDA: diagnóstico de SIDA previo al brote herpético.

## **5. DISCUSSION**

En los últimos años ha habido un interés creciente por la determinación de la sensibilidad a antivirales de los virus y por la capacidad de éstos para crear resistencias. En este tema ha levantado gran interés la aparición de resistencias en los virus de la familia *Herpesviridae*, ya que se trata de uno de los pocos grupos de virus frente a los que se cuenta con antivirales específicos y efectivos. Desde hacía tiempo se conocía que se podían aislar herpesvirus resistentes a antivirales en cultivos celulares <sup>42</sup>, pero éste era un hecho del que no se tenía constancia que ocurriera *in vivo*, hasta que Hirsch y col. publicaron en 1989 un editorial en la prestigiosa revista *The New England Journal of Medicine* titulado "*Resistance to antiviral drugs: the end of innocence*" <sup>81</sup> en el que se hacía eco de lo que parecía ser un problema incipiente, que era la aparición de cepas clínicas de virus de la familia *Herpesviridae* resistentes a antivirales. Desde entonces han proliferado las comunicaciones de aislados clínicos de *Herpesviridae* resistentes a antivirales, así como revisiones sobre el tema que ponen de manifiesto la importancia de este hecho <sup>10,22-24,27,38,53-55,61,62,83,101,102,116,122,123,130-135,148,164,168</sup>, tanto de VHS, como de CMV, EBV y VVZ. Este problema no se limita a los miembros de la familia *Herpesviridae*, sino que ocurre también en otras familias de virus para los que el tratamiento de elección no es tan específico, tal es el caso conocido por todos del VIH y su capacidad de hacerse resistente a los fármacos antirretrovirales normalmente utilizados para combatirlo.

A pesar de esto no existen estudios que analicen todos los aislados de VHS de un hospital general y que den idea de la importancia real y actual del problema, ya que la mayoría de artículos analizan casos aislados o bien

estudian los aislados de algún grupo de población muy concreto  
24,38,69,123,131,132,133,134

### **5.1. DATOS GENERALES**

La falta de estudios españoles y extranjeros que analicen de manera global la evolución de los aislados de VHS en el tiempo hace que no se disponga de una información real de la importancia de las infecciones por VHS en el ámbito hospitalario. De todas formas, es importante reseñar que los resultados de este estudio probablemente no se correspondan al 100% con las infecciones por VHS del ámbito hospitalario, ya que no se solicita habitualmente cultivo de virus de todas las lesiones sugerentes de infección por VHS, quedando muchas de ellas diagnosticadas clínicamente.

A pesar de ésta limitación, sí se puede establecer una correlación entre aislados de VHS en el laboratorio respecto a la cantidad de muestras procesadas en el Servicio de Microbiología y respecto al número de ingresos hospitalarios, lo que nos da una idea aproximada de lo que representa la infección por VHS en el marco general del hospital y del Laboratorio de Microbiología. En este caso, se obtienen 401 muestras con VHS en el periodo de estudio (1991-95), lo que significa que en 0,7 de cada 1.000 muestras enviadas al laboratorio durante ese periodo se consiguió detectar la presencia de VHS por alguno de los medios diagnósticos. A excepción del año 1991, año en el que comenzó su labor el Laboratorio de Virología del HGUGM, se obtienen valores similares de aislados de VHS por 1.000 muestras enviadas al Laboratorio de Microbiología (0,70-0,95) cada año, sin que haya una tendencia clara, ya que el mínimo fue en 1993 (0,70) y el máximo se obtuvo



en 1994 (0,95).

En lo relativo a la cantidad de muestras en las que se detecta la presencia de VHS en función del número de ingresos hospitalarios, en el periodo 1992-1995 no se observó igualmente ninguna tendencia, pareciendo que se está en una situación estable, al igual que en cuanto a las muestras totales recibidas en el Servicio de Microbiología y las procesadas en el Laboratorio de Virología.

Estos datos parecen ser razonables, aunque no se hayan podido comparar con datos similares de la literatura, si tenemos en cuenta que hay estudios que indican que aproximadamente entre el 0,65 y el 15% de los adultos pueden estar eliminando VHS-1 o VHS-2 en un momento dado, aunque no tengan sintomatología de infección herpética <sup>49,80</sup>.

Respecto a la distribución por muestras, se distinguen dos grupos mayoritarios, orofaríngeas y genitales-anales que representan, respectivamente el 47,0% y el 37,8% de todas las muestras identificadas correctamente (n = 302). Estos datos se corresponden con lo reflejado en la literatura, ya que la mayoría de infecciones recurrentes por VHS son herpes labiales y herpes genitales<sup>153</sup> y, evidentemente, la mayoría de cultivos e inmunofluorescencias directas positivos son de muestras procedentes de estas localizaciones.

Observando los resultados del serotipado de los aislados de VHS aislados en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", se ve que el 56,1% (n = 225) fueron del serotipo 1, el 34,7% del serotipo 2, y hubo un 9,2% de cepas que quedaron sin tipar por diversos motivos. La distribución por muestras de los serotipos coincidió con

lo descrito en la literatura <sup>4</sup>, y es que solamente en el 0,4% (n = 1) de las muestras con VHS-1, éste fue aislado a partir de muestras genitales-anales mientras que el VHS-2 fue aislado en el 81,3% a partir de muestras genitales. Entre las muestras con VHS-2 cabe esperar que el porcentaje de aislamientos de muestras genitales sea un poco mayor, ya que en el 13,7% (n = 19) de las muestras con VHS-2 no se pudo determinar el origen exacto al no estar indicado en la petición original de cultivo de virus.

## **5.2. ELECCION DE LOS ANTIVIRALES ESTUDIADOS**

Como se indica en material y métodos, se estudió la sensibilidad de los aislados de VHS a aciclovir, penciclovir y foscarnet.

El aciclovir se eligió por ser actualmente el tratamiento de elección en los casos de infección grave o recurrente por VHS. El foscarnet se eligió por ser el fármaco alternativo en el caso de infecciones por VHS resistentes a aciclovir. Además, es con estos dos antivirales con los que se han hecho la inmensa mayoría de estudios de sensibilidad de VHS.

El penciclovir se eligió por su novedad en el mercado, ya que se introdujo en 1995, aunque como tratamiento para el zóster, y porque había estudios que indicaban su actividad, al menos *in vitro*, frente a aislados de VHS <sup>161</sup>. A pesar de tratarse de otro análogo de nucleósidos con el mismo mecanismo de acción y, previsiblemente, con las mismas tasas de resistencia en aislados de VHS que el aciclovir, se decidió su inclusión en el estudio.

No se introdujeron otros antivirales conocidos, debido a su nulo uso

clínico en el tratamiento de las infecciones por VHS, tal es el caso de la vidarabina, que no se usa en España, y del ganciclovir, cuya indicación es el tratamiento de las infecciones por CMV ya que es menos activo que el aciclovir frente a VHS.

### **5.3. COMPARACION DE LOS METODOS USADOS**

En primer lugar, lo que se hizo fue poner a punto el método de detección rápida de resistencias, protocolo cedido por el Dr. Antonio Tenorio, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Centro de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. Para ello se comenzó determinando la sensibilidad de los aislados de VHS, elegidos de manera aleatoria por éste método y por el método tradicionalmente considerado como estándar, el método de reducción de placas, siguiendo el protocolo de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) <sup>154</sup> y adaptándolo para su realización en placas estériles de 96 pocillos. En ambos protocolos se indicaba que las células sobre las que se debía determinar la sensibilidad eran células Vero. Además, todas las cepas de VHS que mostraron resistencia a alguno de los antivirales estudiados mediante el método rápido fueron sometidas a estudio de sensibilidad mediante el método de reducción de placas. De esta manera se estudiaron 84 aislados clínicos de VHS, entre los que estaban incluídos todos los resistentes ( $n = 32$ ) y un grupo de VHS sensibles a todos los antivirales estudiados ( $n = 52$ ).

De este estudio se concluyó que la técnica rápida de detección de resistencias en aislados clínicos de VHS es una técnica válida, mostrando, para el aciclovir y el penciclovir, unos valores de especificidad, sensibilidad,

valor predictivo positivo y valor predictivo negativo más que aceptables. En el caso del foscarnet, aunque en el apartado de resultados se indica que se obtuvieron unos valores del 100% para todos estos parámetros, en realidad estos valores no son significativos ya que sólo hubo 3 cepas resistentes a este antiviral, si bien las tres se detectaron por los dos métodos y no hubo ninguna discrepancia.

Las ventajas que aporta el método rápido respecto al método estándar son principalmente la mayor sencillez y el menor tiempo requerido tanto para su realización como para la lectura e interpretación de resultados. Otro punto favorable de éste método rápido frente al ERP es que, al ser un método cualitativo en vez de cuantitativo, es mucho más reproducible, y es esta falta de reproducibilidad uno de los grandes inconvenientes de la mayoría de los métodos de detección de resistencias a antivirales. Todo esto es debido a que sólo es necesario comparar el crecimiento de las diferentes diluciones del inóculo del virus en presencia de una concentración fija de cada antiviral (concentración considerada como punto de corte de resistencia en el método estándar) con el crecimiento de las diluciones del inóculo del VHS sin ningún antiviral. El tiempo requerido para realizar el método rápido es de 5 días. En el caso del método de reducción de placas, por el contrario, hay que realizar una titulación previa del inóculo de VHS, lo que dura aproximadamente unos 5 días, ajustar el inóculo a 200-400 UFP/ml, inocularlo en presencia de distintas concentraciones de antivirales, e incubarlo durante 3 días. Posteriormente, en la lectura de las placas hay que contar el número de placas formadas en cada pocillo, y luego, por análisis de regresión lineal hay que calcular la  $CI_{50}$ . Todo ello puede llevarnos 2 semanas de trabajo.

Sin embargo, no todo son ventajas para el método rápido. La desventaja clara respecto al método de reducción de placas es que éste último aporta el dato de la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) y también, si se desea, la  $CI_{90}$  y la  $CI_{99}$ , mientras que el método rápido sólo nos informa sobre si la cepa en estudio es sensible o resistente al antiviral al que se le enfrenta. De todas formas, esta información, en el ámbito hospitalario es suficiente, ya que lo que se busca es controlar que el tratamiento esté correctamente instaurado, de tratar de prever posibles fallos terapéuticos o bien conocer si una posible resistencia a antivirales *in vivo* se corresponde con una resistencia *in vitro*.

Con todos estos datos se decidió seguir el estudio utilizando la técnica de detección rápida de resistencias, por otra parte utilizada ya por otros grupos españoles <sup>106</sup>, como método de despistaje, y nos planteamos que todo aislado que mostrarse alguna resistencia debería confirmarse usando otra técnica, en nuestro caso, la técnica elegida como confirmatoria fue la estándar de reducción de placas.

#### **5.4. DATOS GENERALES DE LA MUESTRA ESTUDIADA**

Como se ha indicado en los resultados, se ha estudiado la sensibilidad de 229 aislados. A pesar de que esta cifra representa el 57,1 % de todas las muestras en las que se detectó VHS en este periodo de tiempo, el número de aislados estudiado es uno de los más grandes de toda la literatura sobre el que se ha realizado un estudio de sensibilidad a antivirales de aislados clínicos de VHS, incluyéndose en ellos, de manera sistemática todos los aislados de VHS, con las excepciones indicadas anteriormente, ya que la mayoría de estudios de sensibilidad de VHS se refieren bien a una cepa concreta o a cepas

procedentes de un grupo muy concreto de pacientes <sup>38,54,55,123,131</sup>.

Las cepas estudiadas parecen una muestra representativa de la totalidad de VHS aislados en el Laboratorio de Virología tanto desde el punto de vista del origen de los aislados, del serotipo así como de la distribución por años.

En el apartado de resultados se ha hecho hincapié en la distribución de los aislados según si provenían o no de pacientes infectados por el VIH, ya que el grupo de pacientes VIH positivo es el grupo mayoritario y va a tener gran importancia en los resultados y discusión posteriores.

#### **5.5. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD**

Los 229 aislados a los que se les realizó el estudio de sensibilidad correspondieron a 219 pacientes, lo que indica que prácticamente no existen muestras repetidas de un mismo paciente, hecho que puede atribuirse a que la mayoría de veces la infección por VHS queda diagnosticada únicamente de manera clínica ya que las lesiones son muy sugerentes de infección herpética y, habitualmente, no son infecciones graves. Debido a que prácticamente no hay muestras repetidas de pacientes, todos los datos de sensibilidad se han expresado respecto al número de aislados, aunque en la práctica se podría extrapolar al número de pacientes.

De las 32 cepas que presentaron algún tipo de resistencia, 23 fueron resistentes a aciclovir, lo que supuso aproximadamente el 10% del total de cepas estudiadas, además todas estas cepas fueron resistentes a penciclovir, lo que parece lógico, ya que aciclovir y penciclovir son análogos de

nucleósidos que requieren la fosforilación por la timidín quinasa vírica para transformarse en el derivado trifosfato que es el metabolito verdaderamente activo. Al tener el mismo mecanismo de acción la actividad de ambos se ve alterada si se producen mutaciones a nivel de la timidín quinasa vírica <sup>22,61</sup>.

Entre las 23 cepas resistentes a aciclovir hay 3 (1,31% del total) que fueron resistentes a aciclovir, penciclovir y foscarnet. El que aparezcan en éstos aislados resistencias múltiples es lógico si se piensa que la resistencia a foscarnet es debida a alteraciones de la ADN polimerasa vírica y que éstas alteraciones generalmente llevan consigo la aparición de resistencias a aciclovir y foscarnet y, aunque posible, las resistencias exclusivas a foscarnet son extremadamente raras <sup>61</sup>. Entre estas 3 cepas hay una que en realidad, si se aplican exactamente los criterios de la ASM, tendría sensibilidad intermedia, ya que por el método de reducción de placas tuvo una  $CI_{50}$  para éste antiviral de 50  $\mu g/ml$  y según la ASM entre 50 y 100  $\mu g/ml$  debe considerarse sensibilidad intermedia al foscarnet. De todas formas, se revisó la historia de este paciente (Tabla XXII, caso nº11) y se vio que existió fallo terapéutico con aciclovir y que no mejoraba con tratamiento con foscarnet, de tal forma que evolucionó hacia la cronificación. Por este motivo se decidió incluir esta cepa dentro de las cepas resistentes a foscarnet.

Un resultado que puede llamar la atención es la presencia de 6 aislados de VHS que fueron resistentes únicamente a penciclovir. Este dato, que en principio no parece lógico, ya estaba descrito por el propio laboratorio farmacéutico que comercializa el famciclovir (profármaco del penciclovir) e indicaba que podría ser debido al metabolismo de las células Vero utilizadas para la determinación de la sensibilidad *in vitro*. Se decidió comprobar este

dato y se determinó la sensibilidad *in vitro* de estos aislados por el método rápido y por el método de reducción de placas pero utilizando fibroblastos de pulmón de feto humano (células MRC-5). Se utilizaron estas células ya que, además de estar disponibles en el laboratorio, son las células sobre las que se han realizado la mayoría de estudios con penciclovir<sup>58</sup>. Los resultados de esta comprobación indicaron que todas estas cepas resistentes a penciclovir, si se determinaba la sensibilidad sobre células MRC-5 se mostraban sensibles. Esto se explica ya que en células MRC-5 la vida media intracelular del penciclovir es mayor que en células Vero<sup>58</sup>, con lo que se alcanzan concentraciones intracelulares de penciclovir mayores que si se utilizaran células Vero, que son las indicadas en los procedimientos para determinación de sensibilidad a antivirales mejor estandarizados<sup>78,154,124</sup>. Este hecho, que ilustra la influencia de la línea celular en los estudios de sensibilidad a antivirales, hecho previamente descrito, también nos da idea de la falta de estandarización que existe hoy día en estos métodos, ya que si bien en este estudio se utiliza una metodología recomendada por una sociedad microbiológica de gran prestigio, cualquier modificación en la línea celular puede llevar a la obtención de resultados diferentes. Es por todo esto que lo más recomendable sería determinar únicamente la sensibilidad a aciclovir y foscarnet de los aislados de VHS, ya que los métodos para su realización parecen estar más aceptados mundialmente y se realizan en la misma línea celular. Además, los dos fármacos están indicados en el tratamiento de las infecciones por VHS, el primero es el tratamiento de elección hoy día y el foscarnet es el tratamiento indicado en las infecciones por VHS resistentes a aciclovir. Sin embargo, el caso del penciclovir es diferente, ya que aunque se muestre activo *in vitro* e *in vivo* frente a VHS, entre las indicaciones del profármaco oral aprobado en España (famciclovir), no está el tratamiento de las infecciones por VHS.



Además, de determinarse la sensibilidad de VHS frente a este fármaco, sería conveniente realizarla en células MRC-5, o si, por estandarización del método, se realiza junto al aciclovir en células Vero, en los casos de discrepancias, se debería comprobar la sensibilidad a penciclovir en células MRC-5. En conclusión, según este estudio, los resultados de sensibilidad a aciclovir serían extrapolables a los del penciclovir, ya que la sensibilidad a uno y otro antiviral coincidía al 100% una vez determinada la sensibilidad a penciclovir en la línea celular MRC-5. En este caso no sería necesario determinar la sensibilidad *in vitro* a penciclovir y bastaría con determinarla a aciclovir.

Si se analizan los resultados de sensibilidad obtenidos según el serotipo de los aislados y el origen de las muestras, se ve que las cepas resistentes a aciclovir y penciclovir fueron 6 VHS-1 de localización principalmente orofaríngea y 14 VHS-2 de las que todos eran de localización genital-anal. Las resistentes a los tres antivirales probados fueron 2 VHS-1 y 1 VHS-2. Ya en otros estudios <sup>136</sup>, se indica que se aíslan más cepas de VHS resistentes a aciclovir de las lesiones herpéticas de zonas genitales y perianales que de otras zonas.

La mayor diferencia de sensibilidad se encuentra al analizar los resultados en función de si el aislado proviene de pacientes infectados por el VIH o no. En este caso se obtiene un porcentaje de cepas resistentes a aciclovir y penciclovir del 10,5% para cepas procedentes de pacientes infectados por el VIH, y del 6,7% para las cepas de pacientes no infectados por el VIH, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Este dato resulta muy válido para poder entender la importancia de los aislados de VHS en un hospital general en el que los pacientes infectados por VIH constituyan

un elevado número, ya que, según este estudio, tienen más riesgo que otros de padecer infecciones por VHS resistentes a aciclovir.

#### **5.6. ESTUDIO DE LAS HISTORIAS CLINICAS DE LOS PACIENTES CON AISLADOS DE VHS RESISTENTES A ACICLOVIR**

Para ver las características clínicas de estas infecciones, se decidió revisar las historias clínicas de los pacientes con aislados de VHS resistentes a aciclovir y que estaban, además infectados por el VIH, ya que suponían la mayoría de los aislados de VHS resistentes. Como grupo control se seleccionaron otros pacientes también infectados por el VIH pero con infección por VHS sensible a aciclovir.

Como se observa en los resultados, se ve que existen diferencias muy claras entre los dos grupos y que un factor que se asocia a la presencia de VHS resistentes es el haber padecido previamente otras infecciones por VHS que hayan sido tratadas con aciclovir, ya que ni la cifra de linfocitos CD4 ni la localización estaban relacionadas. Existen artículos que indican que la localización del brote puede estar relacionada con la aparición de VHS resistente, pero no así el serotipo del aislado <sup>136</sup>. En nuestro caso no aparece una asociación clara en este sentido.

Según el presente estudio, las infecciones por VHS resistentes a aciclovir evolucionan en mayor medida de manera tórpida, provocando lesiones de importancia en un 58,3% de los pacientes, mientras que en el grupo de pacientes con aislados sensibles todos evolucionaron hacia la curación. Esto es lógico ya que en los pacientes con aislados resistentes, el

aciclovir que se instaura como tratamiento no afecta al VHS, de manera que éste va a seguir su curso natural haciendo que las lesiones vayan evolucionando o bien remitan espontáneamente. El porcentaje de infecciones graves en este grupo es elevado, ya que se trata de pacientes muy inmunodeprimidos por la infección por el VIH y, en muchos casos, por tratamientos con corticoides u otros inmunosupresores. El estar recibiendo tratamiento con corticoides u otros fármacos inmunosupresores es otro factor que aparece en este estudio como factor de riesgo para tener VHS resistente a aciclovir, ya que producen una inmunosupresión mayor a la propia de la infección por VIH, poniéndonos en una situación similar a la de los trasplantes de médula ósea, que en otros estudios son el grupo mayoritario con infección por VHS resistentes a aciclovir<sup>54</sup>. En este estudio no hay ningún paciente transplantado de médula ósea ya que este tipo de trasplantes no se realizaba en este hospital durante el periodo de estudio.

Los datos de este estudio no se pueden comparar con muchos estudios similares, ya que, realizando diversas búsquedas bibliográficas sólo se ha encontrado el estudio llevado a cabo por Englund y cols.<sup>54</sup> en 1990, que estudia los aislados de VHS en un centro de asistencia terciaria en Minneapolis, EEUU, otro de Safrin y cols.<sup>136</sup>, que estudia la relación *in vitro-in vivo* de los resultados de sensibilidad de VHS en pacientes infectados por el VIH y un estudio español realizado por Gimeno y cols.<sup>69</sup>.

Englund y cols. estudian la sensibilidad, sólo a aciclovir, por otro método rápido de detección de resistencias basado en el método Hibriwix®, descrito en la introducción, en aislados de 207 pacientes. Detectan una tasa de VHS resistentes a aciclovir del 3,38%. Al desglosar esta resistencia por el

tipo de pacientes, obtuvieron un 4,7% de VHS resistentes a aciclovir en los pacientes inmunocomprometidos y un 0% en inmunocompetentes. Además, todos los pacientes con aislados de VHS resistentes habían recibido tratamiento con aciclovir. Estos resultados, que parecen muy diferentes a los obtenidos en el presente estudio, no lo son tanto, ya que si se analizan más profundamente los resultados de Englund y cols. se observa que la población infectada por el VIH representa sólo el 6,8% (n=14) del total. El mayor porcentaje de resistencias lo obtiene Englund en los aislados de pacientes transplantados de médula ósea, en los que los VHS resistentes a aciclovir representan el 14%.

Safrin y cols. estudian 243 aislados de VHS procedentes de 115 pacientes infectados por el VIH, en los que se aisló VHS resistentes a aciclovir en el 66% de los pacientes. Safrin y cols. postulan que en las lesiones herpéticas de pacientes inmunocomprometidos y, especialmente, de pacientes infectados por el VIH, tienden a predominar las cepas de VHS resistentes a aciclovir, que provocan infecciones ulcerativas y progresivas a pesar del tratamiento con aciclovir. Es precisamente en estos pacientes en los que aparecen la mayoría de aislados resistentes a aciclovir, con las complicaciones que ello conlleva, añadidas a los problemas de base de los pacientes inmunocomprometidos.

Gimeno y cols. estudian la incidencia y significación clínica de los VHS resistentes a antivirales en 198 pacientes inmunocomprometidos, obteniendo una tasa de resistencia a aciclovir del 9,9%, no detectando ninguna cepa de VHS resistente a foscarnet. Al igual que en este estudio, el grupo de pacientes en los que se detectó una mayor tasa de cepas resistentes a aciclovir fue el

de los pacientes infectados por el VIH (15,1%) frente al 6% obtenido en el resto de pacientes (todos ellos transplantados). En este estudio tampoco se incluyó ningún paciente transplantado de médula ósea. En el estudio de Gimeno y cols. el 39% de los pacientes infectados por VHS resistentes a aciclovir tenían una infección herpética que evolucionaba hacia la cronificación o empeoramiento. Este estudio tiene el valor de que, junto con nuestro estudio, son los únicos grandes estudios de sensibilidad de VHS realizados en hospitales españoles, en el caso del estudio de Gimeno y cols. en el Hospital Universitario "Doce de Octubre", de Madrid.

Con todo esto, parece lógico pensar que dependiendo del tipo de hospital y de los pacientes a los que se trate debe ser interesante el estudio de sensibilidad de los aislados de VHS. En el presente caso, en el Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", no parecería lógico, a la vista de los resultados y a la rentabilidad de la técnica, realizar la determinación de la sensibilidad de manera rutinaria a todos los aislados de VHS. Parece más lógico pensar que estos estudios de sensibilidad deberían hacerse exclusivamente con aislados seleccionados de pacientes VIH positivos o inmunodeprimidos en los que exista un mayor riesgo de infección por VHS resistentes a aciclovir o bien en pacientes en los que una evolución tórpida de las lesiones herpéticas haga sospechar la presencia de VHS resistente a aciclovir. Teniendo esto en consideración, lo razonable en el medio donde se ha realizado este estudio sería determinar la sensibilidad a todos los aislados de VHS de los pacientes con infección por VIH avanzada, mientras que en el resto de pacientes sólo en el caso de infecciones que respondan mal al tratamiento.

De todas formas, aunque no se determine la sensibilidad de manera rutinaria por diversas causas, es importante saber de la existencia de estos aislados de VHS que son resistentes al tratamiento habitual y que pueden evolucionar mal, así como saber que su cifra en pacientes VIH no es despreciable. De manera que ante una infección por VHS que no responda al tratamiento, especialmente si se trata de un paciente inmunodeprimido, hay que pensar en la posibilidad de que se trate de una infección por VHS resistente a aciclovir, en las que actualmente la única alternativa terapéutica es el foscarnet.

## **6. CONCLUSIONES**

1. La detección de virus herpes simplex en el Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" se ha mantenido estable en los últimos años, presentando una tasa media de 1,70 VHS por cada 1.000 ingresos hospitalarios y de 0,70 VHS por cada 1.000 muestras enviadas al Laboratorio de Microbiología.

2. El método de detección de resistencias a antivirales propuesto en este estudio es un método válido para su aplicación rutinaria en laboratorios de virología clínica.

3. En el Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" la tasa global de cepas de VHS resistentes a aciclovir es del 8,73% y a foscarnet del 1,31%.

4. Todas las cepas resistentes a aciclovir lo fueron también a penciclovir.

5. Todas las cepas resistentes a foscarnet lo fueron también a aciclovir y a penciclovir.



6. El estudio de sensibilidad de VHS a antivirales debe incluir aciclovir y foscanet como mínimo. Si se estudia la sensibilidad a penciclovir se debe confirmar la existencia de cepas resistentes realizando la determinación de sensibilidad sobre fibroblastos.

7. El grupo de pacientes en donde se ha detectado mayor tasa de aislados de VHS resistentes a aciclovir fue el de pacientes infectados por el VIH en los que esta tasa fue del 10,48% frente al 3,81% obtenida para el resto de pacientes.

8. Las infecciones por VHS resistentes a aciclovir en los pacientes infectados por el VIH tienen una evolución tórpida en más de la mitad de los casos.

9. Todos los pacientes VIH positivos con aislamientos de VHS resistentes a aciclovir cumplan criterios clínicos y analíticos de SIDA.

10. En un laboratorio de Virología Clínica sería recomendable realizar estudios de sensibilidad a antivirales de los aislados de VHS procedentes de pacientes infectados por el VIH, así como de otros pacientes con infección por VHS que no responda bien al tratamiento con aciclovir.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. **Adler-Storthz K, Kendall C, Kennedy RC, Henkel RD, Dreesman GR.** Biotin-avidin amplified immunoassay for detection of herpes simplex virus antigen in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18: 1329-1334.
2. **Albin R, Risano C, Chase R, Lieberman M, Jirau-Lucca G, Ferrari E, Skelton A, Buontempo P, Cox S, Demartino J, Wright J, Kelly J, Afonso A, Kwong AD, O'Connell J, Schwartz J.** SCH 43478 and analogues: *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of novel antiherpesvirus agents. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H43.
3. **Andrei G, Snoeck R, de Clercq E, Fiten P, Opdenakker G.** Identification of mutations in the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) DNA polymerase gene conferring resistance to (S)-1-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl) cytosine (HPMP) derivatives of cytosine (HPMPC, Cidofovir) and adenine (HPMPA). En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H118.
4. **Arvin AM, Prober CG.** Herpes simplex viruses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. Sexta edición. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1995.
5. **Ashley R, Cent A, Maggs V, Nahmias A, Corey L.** Inability of enzyme immunoassays to discriminate between infections with herpes simplex virus

type 1 and 2. *Annals of Internal Medicine*. 1991; 115: 520-526.

6. **Ashley RL, Corey L, Rawls WE.** Herpes simples viruses and herpes B virus. En: Schmidt NJ, Emmons RW. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. Sexta edición. American Public Health Association. Washington DC. 1989.

7. **Ashley RL, Militoni J, Lee F, Nahmias A, Corey L.** Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26: 662-667.

8. **Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland A, Forsgren M.** Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet*. 1991; 337: 189.

9. **Bean B.** Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clinical Microbiology Reviews*. 1992; 5: 146-182.

10. **Bean B, Fletcher C, Englund J, Lehrman SN, Ellis MN.** Progressive mucocutaneous herpes simplex infection due to acyclovir-resistant virus in an immunocompromised patient: correlation of viral susceptibilities and plasma levels with response to therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 1987; 7: 199-204.

11. **Belongia EA, Goodman JL, Holland EJ, Andres CW, Homann SR, Mahanti RL, Mizener MW, Erice A, Osterholm MT.** An outbreak of herpes gladiatorum

at a high-school wrestling camp. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 325: 906.

12. **Ben-Porat T, Tokazewski S.** Replication of herpesvirus DNA. II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virology*. 1977; 79: 292.

13. **Boyd MR, Bacon TH, Sutton D.** Antiherpesvirus activity of 9-(4-Hydroxy-3-Hydroxymethylbut-1-yl)Guanine (BRL 39123) in animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988; 32: 358-363.

14. **Boyd MR, Bacon TH, Sutton D, Cole M.** Antiherpesvirus activity of 9-(4-Hydroxy-3-Hydroxymethylbut-1-yl)Guanine (BRL 39123) in cell culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987; 31: 1238-1242.

15. **Bravo FJ, Vorhees CV, Cappon GD, Bernstein DI.** A new model for evaluation of neurologic sequelae in experimental neonatal herpes simplex virus infection. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract B48.

16. **Brock KE, MacLennan R, Brinton LA, Melnick JL, Adam E, Mock PA, Berry G.** Smoking and infectious agents and risk of in situ cervical cancer. *Cancer Research*. 1989; 49: 4925-4928.

17. **Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, Burchett S, Selke S, Berry S, Vontver LA, Corey L.** Neonatal herpes simplex virus infection in relation to

asymptomatic maternal infection at the time of labor. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 324: 1247.

18. **Brown ZA, Vontver LA, Benedetti J.** Effects on infants of first episode of genital herpes during pregnancy. *The New England Journal of Medicine*. 1987; 317: 1246.

19. **Bryson Y, Dillon M, Bernstein DI.** Risk of acquisition of genital herpes type 2 in sex partners of persons with genital herpes: a prospective couple study. *Journal of Infectious Diseases*. 1993; 167: 942.

20. **Cai W, Gu B, Person S.** Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *Journal of Virology*. 1988; 62: 2596.

21. **Callihan DR, Mengus M.** Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens with human embryonic lung fibroblasts and primary rabbit kidney cell cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984; 19: 287-291.

22. **Chatis PA, Crumacker CS.** Analysis of the thymidine kinase gene from clinically isolated acyclovir-resistant herpes simplex viruses. *Virology*. 1991; 180: 793-797.

23. **Chatis PA, Crumacker CS.** Resistance to herpesviruses to antiviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36: 1589.

24. **Chatis PA, Miller CH, Schrager LE, Crumpacker CS.** Successful treatment with foscarnet of an acyclovir resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 1989; 320: 297-300.
25. **Coen DM.** Acyclovir-resistant, pathogenic herpesviruses. *Trends in Microbiology*. 1994; 2: 481-485.
26. **Collins P, Gower D, Trowbridge M.** *In vivo* evaluation of 2'-deoxy-5-ethyl-thiouridine: a novel anti-herpes compound. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H1.
27. **Collins P, Larder BA, Oliver NM, Kemp S, Smith IW, Darby G.** Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. *Journal of General Virology*. 1989; 70: 375-382.
28. **Connelly BL, Stambery LR.** Herpes simplex virus infections in children. *Current Opinion on Pediatrics*. 1995; 7: 19-23.
29. **Cook SD.** Herpes simplex virus in the eye. *British Journal of Ophthalmology*. 1992; 21: 313.
30. **Corey L, Spear PG.** Infections with herpes simplex virus. *The New England Journal of Medicine*. 1986; 314: 686-757.

31. **Corey I, Spear PG.** Identification of herpes simplex virus 2 sequences in cancer of the cervix. *The New England Journal of Medicine*. 1986; 314: 686-691.
32. **Corey L, Spear PG.** Infections with herpes simplex viruses. *The New England Journal of Medicine*. 1986; 314: 686-757.
33. **Cotarelo M, Catalán P, Menasalvas A, Sanchez-Carrillo C, Cercenado E, Bouza E.** Systematic surveillance of herpes simplex virus (HSV) resistance to penciclovir (PCV), acyclovir (ACV) and foscarnet (FOS). En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H120.
34. **Cotarelo M, Catalán P, Sánchez-Carrillo C, Menasalvas A, Cercenado E, Bouza E.** Resistencia a antivirales de los aislados de virus herpes simplex en un hospital general. En: *Libro de programa y resúmenes del VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. Torremolinos. Málaga. 1996. Resumen 5/18
35. **Cotarelo M, Menasalvas A, Sánchez-Carrillo C, Catalán P, Cercenado E, Bouza E.** Valoración de un método de determinación rápida de sensibilidad de virus herpes simplex a antivirales. En: *Libro de programa y resúmenes del VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. Torremolinos. Málaga. 1996. Resumen 5/17.



36. **Cour Bóveda MI, del Valle Yagüe García M.** Principios de virología. Clasificación de los virus de interés médico. Diagnóstico y tratamiento de las viriasis. En: Díaz-Rubio M, Espinós D. *Tratado de medicina interna*. Editorial Panamericana. Madrid. 1994.
37. **Crooke Rm, Hoke GD, Shoemaker JE.** In vitro toxicological evaluation of ISIS 1082, a phosphorothioate oligonucleotide inhibitor of herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36: 527-532.
38. **Crumpacker CS, Schnipper LE, Marlowe SI, Kowalski PN, Hershey BJ, Levin MJ.** Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir. *The New England Journal of Medicine*. 1982; 306: 343-346.
39. **Dales S, Silverberg H.** Viropexis of herpes simplex virus by HeLa cells. *Virology*. 1969; 37: 475-480.
40. **Dankner WM, Scholl D, Stanat SC, Martin M, Sonke RL, Spector SA.** Rapid antiviral DNA-DNA hybridization assay for human cytomegalovirus. *Journal of Virological Methods*. 1990; 28: 293-298.
41. **Darby G, Larder BA, Inglis MM.** Evidence that 'active centre' of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. *Journal of General Virology*. 1986; 67: 753-758.

42. **Darby G, Salisbury H, Field HJ.** Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir resistance. *Nature (London)*. 1981; 289: 81-83.
43. **DeClercq E.** Comparative efficacy of antiherpes drugs in different cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1982; 21: 661-663.
44. **DeGirolami PC, Dakos J, Eichelberger K, Bianco S.** Evaluation of a new latex agglutination method for detection of antibody to herpes simplex virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26: 1024-1025.
45. **De Rodriguez DJ, Chulia J, Simoes CM, Amoros M, Mariotte AM, Girre L.** Search for *in vitro* antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica*. 1990; 56: 59-62.
46. **De Schryer A, Meheus A.** Epidemiology of sexually transmitted diseases: the global picture. *Bulletin W.H.O.* 1990; 68: 639-654.
47. **Diaz-Mitoma F, Sibbald RG, Shafran SD, the Collaborative Famciclovir Genital Herpes Suppression Group.** Famciclovir in suppression of recurrent genital herpes: results of a multinational study. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H111.

48. **Dillner J, Lenner P, Lehtinen M, Eklund C, Heino P, Wiklund F, Hallmans G, Stendhal U.** A population based seroepidemiological study of cervical cancer. *Cancer Research*. 1994; 54: 134-141.
49. **Douglas RG Jr, Couch RB.** A prospective study of chronic herpes simplex infection and recurrent herpes labialis in humans. *Journal of Immunology*. 1970; 104: 289.
50. **Drew WL, Matthews TR.** Susceptibility testing of herpes viruses. *Clinical Laboratory Medicine*. 1989; 9: 279-286.
51. **Duserre N, Lessard C, Beauchamp D, Désormeaux A, Poulin L, Tremblay M, Bergeron MG.** Biodistribution of free end liposomal foscarnet (PFA) in rats. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H75.
52. **Easterbrook P, Wood MJ.** Successors to acyclovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994; 34: 307-311.
53. **Ellis MN, Keller PM, Fyfe JA, Martin JL, Rooney JF, Straus SE, Nusinoff-Lehrman S, Barry DW.** Clinical isolate of herpes simplex type 2 that induces a thymidine kinase with altered substrate specificity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987; 31: 1117-1125.

54. **Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour HH.** Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Annals of Internal Medicine.* 1990; 112: 416-422.
55. **Erllich KS, Mills J, Chatis P, Mertz GJ, Busch DF, Follansbee SE, Grant RM, Crumpacker CS.** Acyclovir resistant herpes simplex virus infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine.* 1989; 320: 293-296.
56. **Espy MJ, Smith TF.** Detection of herpes simplex virus in conventional tube cell cultures and in shell vials with a DNA probe kit and monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology.* 1988; 26: 22-24.
57. **Evans MJ, Glenister N, Edwards Y, Meyers J, Amsterdam D, Greenberg S, Riepenhoff-Talty M.** Detection of cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex viruses (HSV) by genetic amplification techniques. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H77.
58. Famvir, monografía de producto. SmithKline Beecham. Madrid.
59. **Fayram L, Aarnaes SL, Peterson EM, de la Maza LM.** Evaluation of five cell types for the isolation of herpes simplex virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases.* 1986; 5: 127-133.

60. **Ferrea G, Canessa A, Sampietro S, Cruciani M, Romussi G, Bassetti D.** In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antiviral Research*. 1993; 21: 317-325.
61. **Field AK, Biron KK.** "The end of innocence" revisited: resistance of herpesvirus to antiviral drugs. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994; 7: 1-13.
62. **Field HJ, Coen DM.** Pathogenicity of herpes simplex virus mutants containing drug resistance mutations in the viral DNA polymerase gene. *Journal of Virology*. 1986; 60: 286-289.
63. **Field HJ, Thackray AM.** Effects of famciclovir and valacyclovir in a model of chronic herpes simplex virus infection in immunocompromised mice. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H2.
64. **Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS.** Isolation of a new herpesvirus from CD4+ T cells. *Procedures of the National Academy of Science of the United States of America*. 1990; 158: 748.
65. **Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ.** Glycoprotein C of HSV-1 functions as a C3b receptor on infected endothelial cells. *Nature*. 1984; 309: 633.

66. **Fukuma M, Seto Y, Yamase T.** In vitro antiviral activity of polyoxotungstate (PM-19) and other polyoxometalates against herpes simplex virus. *Antiviral Research.* 1991; 16: 327-339.
67. **Gatell JM, Mensa J, Zamora L.** Foscarnet, un nuevo concepto en antivirales. Primera edición. Editorial Antares. Barcelona. 1995.
68. **Gaudreau A, Balfour Jr HH, Erice A, Hill E, Boivin G.** Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir (ACV)-resistant herpes simplex viruses (HSV) from immunocompromised subjects. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H119.
69. **Gimeno Fernández C.** Virus herpes simpplex resistentes a drogas antivirales: incidencia y significación clínica en pacientes inmunocomprometidos. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1996.
70. **Gleaves CA, Meyers JD.** Determination of patient herpes simplex virus immune status by latex agglutination. *Journal of Clinical Microbiology.* 1988; 26: 1402-1403.
71. **Goade D, Bell R, Mertz GJ, Burke R, Ashley R, Jenison S.** Epitopes of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B that are recognized by human antibodies. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology. Orlando,

Florida, EEUU, 1994. Abstract H6.

72. **Gold D, Corey L.** Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987; 31: 361.

73. **Goldstein LC, Corey L, McDougall JK, Tolentiono E, Nowinski RC.** Monoclonal antibodies to herpes simplex viruses: use in antigenic typing and rapid diagnosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1983; 147: 829-837.

74. **Goordrich JM, Mori M, Gleaves CA.** Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogenic bone marrow transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 326: 1182.

75. **Guinan ME, MacCalman J, Kern ER.** The course of untreated recurrent genital herpes simplex infections in 27 women. *The New England Journal of Medicine*. 1981; 304: 759.

76. **Hakema M, Lehtinen M, Knekt P, Aromaa A, Leinikki P, Miettinen A.** Serum antibodies and subsequent cervical neoplasms: a prospective study with 12 years follow-up. *American Journal of Epidemiology*. 1993; 137: 166-170.

77. **Highlander SL, Sutherland SL, Gage PJ.** Neutralizing monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *Journal of Virology*. 1987; 61: 3356.

78. **Hill EL, Ellis MN, Nguyen-Dinh P.** Antiviral and antiparasitic susceptibility testing. En: Ballows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology*. Quinta edición. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1991.
79. **Hill EL, Hunter GA, Ellis MN.** In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991; 35: 2322-2328.
80. **Hirsch MS.** Herpes simplex virus. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Cuarta edición. Churchill Livingstone. Nueva York. 1995.
81. **Hirsch MS, Shooley RT.** Resistance to antiviral drugs: the end of innocence. *The New England Journal of Medicine*. 1989; 320: 313-314.
82. **Holliday J, Williams MV.** Inhibition of herpes simplex virus types 1 and 2 replication in vitro by mercurithio analogs of deoxyuridine. *Antiviral Research*. 1991; 16: 197-203.
83. **Hwang CB, Ruffner KC, Coen DM.** A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *Journal of Virology*. 1992; 66: 1774-1776.



84. Inouye Y, Tokutake Y, Yoshida T, Seto Y, Hujita H, Dan K, Yamamoto A, Nishiya S, Yamase T, Nakamura S. In vitro activity of polyoxomolybdates. Mechanism of inhibitory effect of PM-104  $(\text{NH}_4)_{12}\text{H}_2(\text{Eu}_4(\text{MoO}_4)(\text{H}_2\text{O})_{16}(\text{Mo}_7\text{O}_{24})_4) \cdot 13\text{H}_2\text{O}$  on human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Reserach*. 1993; 20: 317-331.
85. Johnson JR, Egaas S, Gleaves CA. Hepatitis due to herpes simplex virus in marrow-transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 1992; 14: 38.
86. Johnston SLG, Wellens K, Siegel CS. Rapid isolation of herpes simplex virus by using mink lung and rhabdomyosarcoma cell cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28: 2806-2807.
87. Jones C. Cervical cancer: is herpes simplex virus type II a cofactor?. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8: 549-556.
88. Jones PC, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VII. The transcription program consists of three phases during which transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *Journal of Virology*. 1979; 31: 299.
89. Jones TJ. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infection: reply. *Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172: 603.
90. Jones TJ, Paul R. Disseminated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 treated successfully with foscarnet. *Journal of Infectious Diseases*. 1995; 171: 508-509.

91. **Kalman CM, Laskin OL.** Herpes zoster and zosteriform herpes simplex virus infections in immunocompetent adults. *American Journal of Medicine.* 1986; 81: 775.
92. **Kessler I.** Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer.* 1977; 39: 1912-1929.
93. **Kusne S, Schwartz M, Breining MK.** Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults. *Journal of Infectious Diseases.* 1991; 163: 1001.
94. **Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J.** Recurrences after oral and genital herpes infection and viral type. *The New England Journal of Medicine.* 1987; 316: 1444.
95. **Lalezari JP, Drew WL, Glutzer E, Miner D, Safrin S, Owen WF Jr, Davidson JM, Fisher PE, Jaffe HS.** Treatment with intravenous (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]-cytosine of acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with AIDS. *Journal of Infectious Diseases.* 1994; 170: 570-572.
96. **Lee FK, Coleman RM, Pereira L, Bailey PD, Tatsumo M, Nahmias AJ.** Detection of herpes simplex virus type 2-specific antibody with glycoprotein G. *Journal of Clinical Microbiology.* 1985; 22: 641-644.

97. **Lenette ET.** Epstein-Barr virus. En: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, supplement 1*. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1994.
98. **Littler E, Lowe D, Collins P, Snowden BW, Ertl P, Alderton W.** 2'-deoxy-5-ethyl-4'-thiouridine (4'-S-EtdU), a nucleotide analogue with improved anti-herpesvirus activity. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H53.
99. **Lopez C.** Resistance to herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Current Topics of Microbiology and Immunology*. 1981; 92: 15.
100. **Marcy AI, Hwang CBC, Ruffner KL, Coen DM.** Engineered herpes simplex virus DNA polymerase point mutants: the most highly conserved region shared among alpha-like DNA polymerases is involved in substrate recognition. *Journal of Virology*. 1990; 64: 5883-5890.
101. **Marcy AI, Yager DR, Coen DM.** Isolation and characterization of herpes simplex virus mutants containing engineered mutations at the DNA polymerase locus. *Journal of Virology*. 1990; 64: 2208-2216.
102. **Marks GL, Nolan PE, Erlich KS, Ellis MN.** Mucocutaneous dissemination of acyclovir-resistant herpes simplex virus in a patient with AIDS. *Reviews of Infectious Diseases*. 1989; 11: 474-476.

103. **Mertz GJ, Loveless MO, Kraus SJ, Tying SK, Fowler SL, the collaborative famciclovir genital herpes research group.** Famciclovir for supression of recurrent genital herpes. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H3.
104. **McCollum, Luizzi M.** Mechanism of action of BILD 733: an antiviral peptidomimetic subunit association inhibitor of herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H45.
105. **McLaren C, Ellis MN, Hunter GA.** A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Research*. 1983; 3: 223-224.
106. **Mellado P, Melón S, de la Iglesia P, López B, Rodríguez M, García MJ, de Oña M.** Ensayo rápido de sensibilidad a aciclovir en cepas de herpes simplex. En: *Libro de resúmenes del IV Congreso Nacional de Virología*. Sociedad Española de Virología. Madrid, 1995.
107. **Mellerick DM, Fraser NW.** Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology*. 1987; 158: 265.

108. **Melnick JL.** Taxonomy of viruses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. Sexta edición. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1995.
109. **Merigan TC, Renland DG, Keay S.** A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 326: 1182.
110. **Mertz GJ, Benedetti J, Ashley R.** Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Annals of Internal Medicine*. 1992; 116: 197.
111. **Miller MJ, Howell CL.** Rapid detection and identification of herpes simplex virus in cell culture by a direct immunoperoxidase staining procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18: 550-553.
112. **de Miranda P, Burnette TC, Smith C, Harrington J, Reardon J.** Mechanisms of the enhanced bioavailability of acyclovir with the prodrug valacyclovir HCl (Valtrex®). En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract A70.
113. **Miranda QR, Bailey GD, Fraser AS, Tenoso HJ.** Solid-phase enzyme immunoassay for herpes simplex virus. *Journal of Infectious Diseases*. 1977; 136(Suppl): S304-S310.

114. **Mitchel CD, Bean B, Gentry SR.** Acyclovir therapy for mucocutaneous herpes simplex infection in immunocompromised patients. *Lancet*. 1981; 1: 1389.
115. **Modiano P, Salloum E, Gillet-Terver MN, Barbaud A, Georges JC, Thouvenot D, Schmutz JL, Weber M.** Acyclovir-resistant chronic cutaneous herpes simplex in Wiskott-Aldrich syndrome. *British Journal of Dermatology*. 1995; 133:475-478.
116. **Mouly F, Baccard M, Scieux C, Schnell L.** Chronic recurrent acyclovir resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *Dermatology*. 1995; 190: 177.
117. **Nahmias AJ, Norrild L.** Oncogenic potential of herpes simplex viruses and their association with cervical cancer. En: *Rapp F. Oncogenic herpes viruses*. CRC Press. Boca Raton, Florida, EEUU. 1980.
118. **Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine AN, Takei Y, Alford CA, the Collaborative Antiviral Study Group.** Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *Journal of Infectious Diseases*. 1982; 145: 829-836.
119. **Naraqi S.** Cytomegalovirus. En: Belshe RB. *Textbook of human virology*. PSG Publishing. Littleton, Massachusetts, EEUU. 1984.

120. **Nerurkar LS, Namba M, Brashears C, Jacob AJ, Lee YS, Sever JL.** Rapid detection of herpes simplex virus in clinical specimens using a capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984; 20: 109-114.
121. **Norkin LC.** Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8: 293-315.
122. **Palu G, Gerna G, Bevilacqua F, Marcello A.** A point mutation in the thymidin kinase gene is responsible for acyclovir-resistance in herpes simplex type 2 sequential isolates. *Virus Research*. 1992; 25: 133-144.
123. **Parris DS, Harrington JE.** Herpes simplex virus variants resistant to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1982; 22: 71-77.
124. **Pérez Sáenz JL, de Oña Navarro M, Gimeno Cardona C, Mendoza Montero J.** Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus. En: Picazo JJ, Cisterna Cáncer R, Echevarría Mayo JM, Gobernado Serrano M, Fuertes Ortiz A, Piédrola Angulo G, Jiménez de Anta MT, Rodríguez Noriega A, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Romero Vivas J. *Procedimientos en microbiología clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid, 1994.
125. **Pouletty P, Chomel JJ, Thouvenot D, Catalan F, Rabillon V, Kadouche J.** Detection of herpes simplex virus in direct specimens by immunofluorescence assay using a monoclonal antibody. *Journal of Clinical*

*Microbiology*. 1987; 25: 958-959.

126. **Raborn GW, the Penciclovir Topical Collaborative Study Group.** Penciclovir cream for recurrent herpes simplex labialis: an effective new treatment. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H81.

127. **Ramsey PG, Fife KH, Hackman RC.** Herpes simplex virus pneumonia: clinical, virologic, and pathologic features in 20 patients. *Annals of Internal Medicine*. 1982; 97: 813.

128. **Richman DD, Cleveland PH, Redfield DC, Oxman MN, Wahl CM.** Rapid viral diagnosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1984; 149: 298-310.

129. **Sacks SL, Aoki FY, Diaz-Mitoma F, Sellors J, Shafran S, Romanowski B, Martel A, Williams K, Haase D, St. Pierre C, Papp K, Sibbald R, Givan K, Poisson M, Lawee D, the Canadian cooperative study group.** Patient-initiated treatment (Tx) of recurrent genital herpes (RGH) with oral famciclovir (FCV): a Canadian, multicenter, placebo (PLB)-controlled, dose ranging study. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H4.

130. **Sacks SL, Wanklin RJ, Reece DE, Hicks KA, Tyler KL, Coen DM.** Progressive esophagitis from acyclovir-resistant herpes simplex. Clinical roles for DNA polymerase mutants and viral heterogeneity. *Annals of Internal*



*Medicine*. 1989; 111: 893-899.

131. **Safrin S**. Treatment of acyclovir-resistant herpes simplex virus infection in a patient with AIDS. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome*. 1992; 5 (Supl 1): S29-S32.

132. **Safrin S**. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections. *Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172: 603.

133. **Safrin S, Assaykeen T, Follansbee S, Mills J**. Foscarnet therapy for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients: preliminary data. *Journal of Infectious Diseases*. 1990; 161: 1078-1084.

134. **Safrin S, Bergert TG, Gilson I**. Foscarnet therapy in five patients with AIDS and acyclovir-resistant varicella-zoster virus infection. *Annals of Internal Medicine*. 1991; 115: 19.

135. **Safrin S, Crumpacker C, Chatis P, Davis R, Hafner R, Rush J, Kessler HA, Landry B, Mills J, the AIDS Clinical Trials Group**. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 325: 551-555.

136. **Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, Mills J**. Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human

immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 1246-1250.

137. **Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, Smith T, Weissbach N, De Veranez D, Phan LD, Cohn D.** Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*. 1994; 169: 193-196.

138. **Saiag P, Chastang C, Bertin I, the Genival Study Group.** Efficacy and safety equivalence of 100 mg once-daily and 500 mg twice-daily valaciclovir in recurrent genital herpes. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H113.

139. **Schmidt NJ, Dennis J, Devlin V, Callo D, Mills J.** Comparison of direct immunofluorescence and direct immunoperoxidase procedures for detection of herpes simplex virus antigen in lesion specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18: 445-448.

140. **Sears AG.** Mechanisms of restriction of viral gene expression during herpes simplex virus latency. En: Lopez C, Mori R, Roizman B, Whitley RJ. *Immunology and prophylaxis of human herpesvirus infections*. Plenum. Nueva York. 1990.

141. **Seigal FP, Lopez C, Hammer GS.** Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *The New England Journal of Medicine*. 1981; 305: 1439.

142. **Senra Varela A, Girón González JA.** Infecciones por herpesvirus (I) (Herpes simplex virus y Varicella-zoster virus). En: Díaz-Rubio M, Espinós D. *Tratado de medicina interna*. Editorial Panamericana. Madrid. 1994.
143. **Sewell DLI, Horn SA.** Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985; 21: 445-448.
144. **Shaw T, Amor P, Civitico G, Boyd M, Locarnini S.** In vitro antiviral activity of penciclovir, a novel purine nucleoside, against duck hepatitis B virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 719-723.
145. **Snoeck R, Andrei G, Gerard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, Sadzot-Delvaux C, Tricot G, Clumeck N, De Clercq E.** Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]-cytosine (HPMPC). *Clinical Infectious Diseases*. 1994; 18: 570-578.
146. **Snoeck R, Andrei G, Holy A, de Clercq E.** Antiherpetic activity of new acyclic nucleoside phosphonate derivatives. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract F174.
147. **Spruance SL, Bernstein DI, Schleupner CJ, Evans TE, Bryson YJ, Blumberg D, Grafford K, Martin-Munley S.** Foscarnet cream in the treatment of experimental ultraviolet radiation (UVR)-induced herpes labialis: a double-

blind, placebo controlled, multi-center trial. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H114.

148. **Spruance SL, Stewart JCB, Rowe NM.** Treatment of recurrent herpes simplex labialis with oral acyclovir. *Journal of Infectious Diseases*. 1990; 161: 185.

149. **Stanat SC, Reardon JE, Erice A, Jordan MC, Drew WL, Biron KK.** Ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates: mode of resistance to ganciclovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991; 35: 2191-2197.

150. **Stein DS.** Prophylactic therapies for herpes viruses in HIV infection- Do they effect survival? En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Symposium.

151. **Stevens JG.** Transcripts associated with herpes virus latency. En: Lopez C, Mori R, Roizman B, Whitley RJ. *Immunology and prophylaxis of human herpesvirus infections*. Plenum. Nueva York. 1990.

152. **Storch GA.** Polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of viral infections of the central nervous system (CNS). En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract S31.

153. **Straus SE.** Introduction to *Herpesviridae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Cuarta edición. Churchill Livingstone. Nueva York. 1995.
154. **Swierkosz EM, Biron KK.** Antiviral susceptibility testing. En: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, supplement 1*. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1994.
155. **Swierkosz EM, Biron KK.** Antiviral agents and susceptibility testing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. Sexta edición. American Society for Microbiology Press. Washington DC. 1995.
156. **Swierkosz EM, Scholl DR, Brown JL, Jollick JD, Gleaves CA.** Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987; 31: 1465-1469.
157. **Tevethia MJ.** Transforming potential of herpes simplex viruses and human cytomegalovirus. En: Roizman B. *The herpesviruses*. Plenum. Nueva York. 1982.
158. **Thatckray AM, Field HJ.** Evidence from a murine immunosuppression model that famciclovir is effective against an on-going chronic herpes simplex virus infection. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H112.

159. **Tyler KL, Fields BN.** Introduction to viruses and viral diseases. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth Edition. Churchill Livingstone. Nueva York. 1995.
160. **Vere Hodge RA, Perkins RM.** Mode of action of 9-(4-Hydroxy-3-Hydroxymethylbut-1-yl)Guanine (BRL 39123) against herpes simplex virus in MRC-5 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989; 33: 223-229.
161. **Vere Hodge RA, Sutton D, Boyd MR, Harden MR, Jarvest RL.** Selection of an oral prodrug (BRL 42810; Famciclovir) for the antiherpesvirus agent BRL 39123 [9-(4-Hydroxy-3-Hydroxymethylbut-1-yl)Guanine; Penciclovir]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989; 33: 1765-1773.
162. **Wald A, Barnum G, Selke S, Davis G, Zeh J, Corey L.** Acyclovir supresses asymptomatic shedding of HSV-2 in the genital tract. En: *Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Orlando, Florida, EEUU, 1994. Abstract H5.
163. **Warford AL, Levy RA, Rekrut KA, Steinberg E.** Herpes simplex virus testing of an obstetric population with an antigen enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1986; 154: 21-28.
164. **Whitley RJ.** Antiviral resistance: do we know what it means?. *Current Opinion on Infectious Diseases*. 1994; 7: 671-673.

165. **Whitley R, Arvin A, Prober C.** A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 324: 444.
166. **Whitley RH, Soong SJ, Hirsch MS.** Herpes simplex encephalitis. Vidarabine therapy and diagnostic problems. *The New England Journal of Medicine*. 1981; 304: 313.
167. **Whitley RJ.** Epidemiology of herpes simplex viruses. En: Roizman B. *The herpesviruses*. Plenum. Nueva York. 1982.
168. **Whitley RJ, Gnann JW Jr.** Acyclovir: A decade later. *The New England Journal of Medicine*. 1992; 324: 782.
169. **Whitley RJ, Nahmias AJ, Soong S.** Vidarabine therapy of neonatal herpes simplex virus infection. *Pediatrics*. 1980; 66: 495.
170. **Wildy P.** Herpes: history and classification. En: Kaplan AS. *The Herpesviruses*. Academic Press. Nueva York. 1973.
171. **Yang H, Dalton J, Drain R, Han ST, Clark J.** Lobucavir (BMS-180194): a new herpesvirus topical agent effective against cutaneous infection in Guinea pigs. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H117.
172. **Yoshikawa T, Hill JM, Stanberry LR, Bourne N, Krause PR.** Site-

specificity of herpes simplex virus (HSV) reactivation is encoded by the latency-associated transcript (LAT) region. En: *Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Nueva Orleans, Louisiana, EEUU, 1996. Abstract H79.

173. **Zhao L, Landry ML, Balkovic ES, Hsiung CD.** Impact of cell culture sensitivity and virus concentration on rapid detection of herpes simplex virus by cytopathic effects and immunoperoxidase staining. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987; 25: 1401-1405.